



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Agrosystèmes, Ecosystèmes et Environnement*

Présentée et soutenue par *Clémentine ALLINNE*

Le 04/11/2009

Titre : *Modélisation écophysiological et analyse génétique pour la recherche de génotypes de tournesol adaptés aux basses températures causées par des semis précoces*

JURY

LE GOUIS Jacques (*directeur de recherche INRA, Clermont-Ferrand*): président du jury
DURR Carolyne (*ingénieur de recherche INRA, Angers*): rapporteur
HENRY Yves (*directeur de recherche CNRS, Orsay*): rapporteur
FLENET François (*direction scientifique CETIOM, Grignon*): examinateur
MAURY Pierre (*maître de conférences INP/ENSAT, Toulouse*): examinateur
GRIEU Philippe (*professeur des universités INP/ENSAT, Toulouse*): directeur de thèse
SARRAFI Ahmad (*professeur des universités INP/ENSAT, Toulouse*): directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries*

Unité de recherche : *UMR 1248-AGIR Agrosystème et Développement Territorial*

Directeur(s) de Thèse : *GRIEU Philippe /SARRAFI Ahmad*

Rapporteurs : *DURR Carolyne /HENRY Yves*

Remerciements :

En espérant n'oublier personne, je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont joué un rôle important dans la réalisation de ce travail et qui ont permis à un moment ou un autre son aboutissement,

Tout d'abord, en qualité de directeurs de cette thèse, je remercie Philippe Grieu et Ahmad Sarrafi ainsi que Pierre Maury qui a participé à l'encadrement de celle-ci.

Pour m'avoir accueillie dans l'unité AGIR et plus spécifiquement au sein de l'équipe VASCO, je suis particulièrement reconnaissante à l'égard de Michel Duru, mais également à tous les membres de l'unité avec qui j'ai pu échanger des conversations dans un coin de la salle café ou dans un couloir.

Pour leur aide et leurs précieux conseils scientifiques, je tiens à remercier tout d'abord Philippe Debaeke et Pierre Casadebaig, mais également Jean-Marie Nolot, Jean-Noël Aubertot, et Daniel Wallach.

Pour leur aide technique, plus qu'essentielle, qui m'a permis d'obtenir toutes les données recueillies, je remercie vivement Michel Labarrère, mais également Didier Raffailac ainsi que Pierre Perrin. Je n'oublie pas tous les étudiants qui ont travaillé avec nous sans compter les heures : Nedjwa Ghoribi, Morgane, Jean-Pierre et Marion.

Un grand merci également à Nadia Ikkeff et Abdelhamid Djekoun pour leur collaboration et leur accueil en Algérie.

Pour leur présence et leurs soutiens quotidiens je remercie tous mes collègues doctorants, stagiaires ou en contrat à durée déterminée : Lucie, Laurent, Pierre, Solène G., Guillaume, Jérôme, Tuki, Célia, Julie, Amélie, Marine, Solène F., qui ont passé ces trois années entièrement ou partiellement, dans la même « galère ».

Pour leurs encouragements, leur confiance, leur patience, et leur soutien, un énorme merci à tous mes proches qui m'ont supportée pendant ces trois dernières années et ont rendu ma vie « hors thèse » (car il y en a une !) douce et agréable, ce qui allège le poids du labeur : Aude, Aurélie, Mélanie, Saskia, Vanessa, Fred, Léon, et bien sûr ma famille, mes parents, Cécile et Joëlle qui m'ont toujours soutenue et aidée dès et tant qu'ils le pouvaient. Je souhaite remercier spécialement Thomas, parce qu'il croit en moi souvent bien plus que moi-même, et parce que son soutien est indispensable à mes yeux.

Pour son aide moral et psychologique, je remercie Christine, son écoute et ses conseils avisés m'ont permis de supporter les moments difficiles.

Pour m'avoir donné l'envie de faire de la recherche et parce qu'ils ont joué pour moi un rôle déterminant dans ma conception de l'interdisciplinarité je remercie Thierry Robert et Anne Luxereau.

Enfin, parce que son esprit profondément scientifique a certainement influencé ma vision du monde et a fait qu'aujourd'hui j'ai toujours cette envie de « tout comprendre », je souhaite rendre hommage à mon grand-père Jean Allinne.

Résumé :

Le semis précoce du tournesol, d'un à deux mois par rapport à la période habituelle (Avril dans le sud ouest de la France), a été envisagé pour esquiver les périodes de sécheresses estivales. Cette stratégie conduit à un abaissement des températures de l'ordre de 5 à 10°C durant les premières phases de développement de la culture. L'objectif de ce travail est donc d'identifier des génotypes de tournesol adaptés à des conditions de basses températures en début de cycle, et de fournir des outils pour la sélection de ces nouveaux idéotypes.

Dans un premier temps le modèle de culture SUNFLO, développé pour l'analyse des interactions génotype x environnement chez le tournesol, a été utilisé pour identifier par simulation un idéotype pour le semis précoce. Cette étude a révélé que le type variétal valorisant le mieux de semis précoce présente une levée précoce et un cycle tardif. Dans un deuxième temps, la variabilité génétique d'une population de lignées recombinantes de tournesol a été analysée pour des traits agro-morphologiques et physiologiques caractérisant le développement (vitesse de germination, phénologie) et la croissance à basse température (élongation de l'hypocotyle, production de biomasse, et traits physiologiques impliqués dans la tolérance au froid). L'analyse génétique de ces caractères a permis d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans la variation de ces caractères (QTLs) ainsi que les marqueurs moléculaires associés à ces QTLs qui représentent des marqueurs d'intérêts pour la sélection. L'analyse des processus impliqués dans la levée (germination et élongation de l'hypocotyle) montre que la température de base pour l'élongation de l'hypocotyle présente un gain génétique significatif à basse température. Ce trait est sous le contrôle génétique de deux QTLs majeurs dont l'un, qui explique 40% de la variabilité phénotypique observée, est lié au marqueur SSR *ORS1128*. Le temps thermique du semis à la floraison est un caractère contrôlé par des QTLs spécifiques en conditions de semis précoces, parmi lesquels deux sont colocalisés avec des QTLs identifiés pour des traits relatifs à la levée. L'étude des traits physiologiques impliqués dans la réponse aux basses températures a révélé que le tournesol a un potentiel de sélection pour la tolérance au froid, notamment pour le potentiel osmotique. Le maintien des membranes plasmiques stables à basses températures est également un trait jouant un rôle important dans la tolérance au froid. Un QTL à effet majeur lié au marqueur SSR *ORS331_2* a été identifié pour ce trait et pourrait être utilisé pour aider à la sélection de génotypes de tournesol adaptés au froid.

Mots clés : tournesol, tolérance froid, semis précoces, idéotype, modélisation, QTL.

Abstract :

Early sowing to escape the drought during summer was studied in sunflower. Sowing one or two months earlier leads to reduce about 5 to 10°C during first stages of development compared with traditional sowing (April in south parts of France) in this species. The aim of this study is to identify sunflower genotypes adapted for low temperature and to identify tools for selecting them.

Firstly the crop model SUNFLO, Which is developed to analyze “genotype x environment” interactions in sunflower, was used to identify by simulation favorable ideotypes for early sowing. Results show that they have to present early emergence and a late development cycle. Then, several experiments were undertaken to study genetic variability for agro-morphologic and physiologic traits under early sowing in sunflower. A population of 95 recombinant inbred lines and their two parents were used at low temperature in all experiments. Germination rate, hypocotyl elongation, biomass production and some physiological traits for cold tolerance were studied. Genetic analyses were performed and genomic regions (QTLs) involved in the variation of these traits as well as SSR markers associated with them were identified.

Analysis of physiological processes related to emergence (germination and hypocotyl elongation) show that the base temperature of hypocotyl elongation presents a significant genetic gain at low temperature. This trait is controlled by two major QTLs and one of them explains 40% of the phenotypic variance and contains the SSR marker *ORS1128*. The thermal time from sowing to flowering is controlled by specific QTLs in early sowing and two of them are collocated with QTLs detected for emergence related-traits. The study of physiological traits implied with response to low temperature showed that sunflower present a high potential for cold tolerance variability, especially for the osmotic potential. The cell membrane stability at low temperature is also an important trait for cold tolerance. A major QTL associated with the SSR marker *ORS331_2* was identified for this trait and should be used to select sunflower cold tolerant genotypes.

Key words: Sunflower, cold tolerance, early sowing, genotype, crop modeling, QTL.

Table des matières

1	INTRODUCTION GENERALE	1
1.1	Contexte général : Les systèmes de cultures innovants	1
1.1.1	Enjeux (environnementaux et socio-économiques)	1
1.1.2	Mise en œuvre	1
1.1.3	Outils d'aide à la sélection de variétés innovantes, à la conception et à l'évaluation de nouvelles conduites de culture	3
1.2	Présentation du tournesol	4
1.2.1	Historique de la culture	4
1.2.2	Cycle de développement et technique culturale dans le sud-ouest	5
1.2.3	Augmenter la compétitivité de la culture du tournesol : le projet Tournesol 2010	7
1.2.4	Mise en place d'une stratégie d'esquive	7
1.3	Objectif et démarche de la thèse	8
2	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	10
2.1	Modélisation dynamique d'un peuplement cultivé	10
2.1.1	Modélisation de la phase de croissance hétérotrophique	10
2.1.2	Modélisation de la phase de croissance autotrophique	11
2.1.3	Modèle de culture et modélisation des interactions génotype X environnement	12
2.1.3.1	Définition d'un modèle de culture	12
2.1.3.2	Le modèle SUNFLO	13
2.2	Modifications physiologiques induites par les basses températures	21
2.2.1	Fonctionnement physiologique à basses températures	21
2.2.1.1	Tolérance vs acclimatation	21
2.2.1.2	Evénements primaires de réponse	22
2.2.1.3	Principaux mécanismes d'acclimations aux basses températures	25
2.2.1.4	Outils de diagnostic de l'effet des basses températures	26
2.2.2	Effet du semis précoce et des basses températures associées sur la croissance et le développement	31
2.2.2.1	Basses températures et développement	31
2.2.2.2	Effet du semis précoce et des basses températures sur la productivité	33
2.3	Analyse génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques impliqués dans la tolérance et l'acclimatation aux basses températures	35
2.3.1	Analyse de la variabilité génétique	35
2.3.2	Recherche et identification de QTLs	36
2.3.2.1	Définition et intérêts	36
2.3.2.2	QTLs impliqués dans la réponse aux basses températures	37
2.3.3	Cartes génétiques et identification de QTLs à intérêt agronomique chez le tournesol	38
3	MATERIELS ET METHODES	42
3.1	Matériel végétal	42
3.1.1	Population de lignées recombinantes	42
3.1.2	Variétés issues du progrès génétique	42
3.2	Conditions de cultures	43
3.2.1	Au champ	43
3.2.2	En condition contrôlée	43
3.3	Mesure des traits agro-morphologiques et physiologiques	44
3.3.1	Caractères de croissance et de développement impliqués dans le formalisme du modèle SUNFLO	44

3.3.2	Mesure des caractères physiologiques impliqués dans la réponse aux basses températures	46
3.3.2.1	<i>Fonctionnement photosynthétique</i>	46
3.3.2.2	<i>Stabilité des membranes plasmiques (REL)</i>	48
3.3.2.3	<i>Potentiel osmotique</i>	48
3.4	Analyse génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques	49
3.4.1	Variabilité génétique et gain génétique	49
3.4.2	Détection des QTLs chez les lignées recombinantes (LIRs).....	49
4	RESULTATS ET DISCUSSION	50
4.1	Analyse et modélisation des interactions génotype x environnement x conduite dans le cas de semis précoces du tournesol et de son exposition aux basses températures en période juvénile.....	50
4.1.1	Introduction.....	50
4.1.2	Evaluation de la qualité prédictive du modèle en condition de semis précoces	52
4.1.2.1	<i>Introduction</i>	52
4.1.2.2	<i>Matériels et méthodes</i>	52
4.1.2.3	<i>Résultats</i>	56
4.1.2.4	<i>Discussion : évaluation de SUNFLO en semis précoce</i>	64
4.1.3	Simulation de scénarii de semis précoces avec des génotypes virtuels.....	69
4.1.3.1	<i>Introduction</i>	69
4.1.3.2	<i>Matériels et méthodes</i>	70
4.1.3.3	<i>Résultats</i>	73
4.1.3.4	<i>Discussion</i>	78
4.1.4	Conclusion	82
4.2	Etude génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques impliqués dans le fonctionnement de génotypes de tournesol soumis à des contraintes de basses températures en début de cycle	83
4.2.1	Introduction.....	83
4.2.2	Présentation et résumés des articles	85
4.2.2.1	<i>Estimation des températures de base de germination et d'élongation de l'hypocotyle chez le tournesol</i>	85
4.2.2.2	<i>Phénologie et production de biomasse en conditions de semis précoces associées à des basses températures</i>	86
4.2.2.3	<i>Contrôle génétique de caractères physiologiques impliqués dans la tolérance au froid associé à la croissance à basses températures du tournesol dans des conditions de semis précoces</i>	87
4.2.3	QTL mapping for germination and seedling growth under low temperature in sunflower	89
4.2.4	QTL mapping of phenology and vegetative growth traits in sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) under early sowing associated with low temperature conditions.	109
4.2.5	Genetic control of physiological traits for cold tolerance associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions.....	129
4.2.6	Conclusion	140
5	CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	142
6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	147

1 INTRODUCTION GENERALE

1.1 Contexte général : Les systèmes de cultures innovants

1.1.1 Enjeux (environnementaux et socio-économiques)

Afin de répondre aux objectifs affichés par les politiques agricoles d'après-guerre (autosuffisance nationale en produits agricoles, réductions des prix des aliments, libération de main-d'œuvre pour les autres secteurs économiques, sécurité sanitaire des aliments...), les modes de production de l'agriculture française se sont profondément transformés depuis cinquante ans. L'agriculture productiviste, devenue le système majeur de production, suscite depuis une dizaine d'années un profond débat au sein de la société. Ce dernier porte principalement sur quatre points décrits par Meynard (Meynard, 2008) devant chacun amener à une remise en question des méthodes des producteurs, des filières de distribution et des habitudes des consommateurs :

- la dégradation de l'état de l'environnement liée aux pratiques agricoles (perte de la biodiversité, pollution de l'eau et des sols par l'azote, le phosphore, les pesticides et les métaux lourds, l'érosion des sols, l'émission de gaz à effet de serre, épuisement des ressources en eau et en énergies fossiles),
- la compétitivité des exploitations agricoles dans un contexte de mondialisation des échanges (accroissement de la taille des exploitations, monoproduction),
- les attentes des consommateurs et de la demande des filières de distribution (maintien de prix bas pour les produits alimentaires en particulier dans la grande distribution),
- le rôle de l'agriculteur dans la gestion du territoire (adéquation entre les systèmes agricoles et les autres activités rurales, environnementales et touristiques).

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces débats et de pouvoir à terme produire autrement, il faut transformer les systèmes de culture pour les rendre plus innovants, plus économes des ressources environnementales donc compatibles avec un développement durable.

1.1.2 Mise en œuvre

La durabilité d'un système en production végétale doit être évaluée en tenant compte des trois dimensions : environnementale, économique et sociale. Pour chacune de ces dimensions,

l'évaluation peut se faire à des échelles plus ou moins grandes : parcelle/exploitation, filière de production, territoire, planète (Bockstaller *et al.*, 2008). Un système innovant et durable doit être pensé de façon à pouvoir s'adapter à de nouvelles contraintes (biotiques et/ou abiotiques) en laissant le maximum de flexibilité dans le système, à chaque étape de sa construction. Par exemple dans de cas de l'élaboration d'un système de grande culture que l'on veut raisonner en fonction de la disponibilité en eau, il faut réfléchir aux différentes stratégies possibles afin d'optimiser le système. La figure 1 permet de rendre compte de la complexité d'un système de culture et met en évidence les principales étapes du système sur lesquelles peuvent s'appliquer les différentes stratégies envisagées pour raisonner la consommation en eau (Debaeke et Bertrand, 2008).

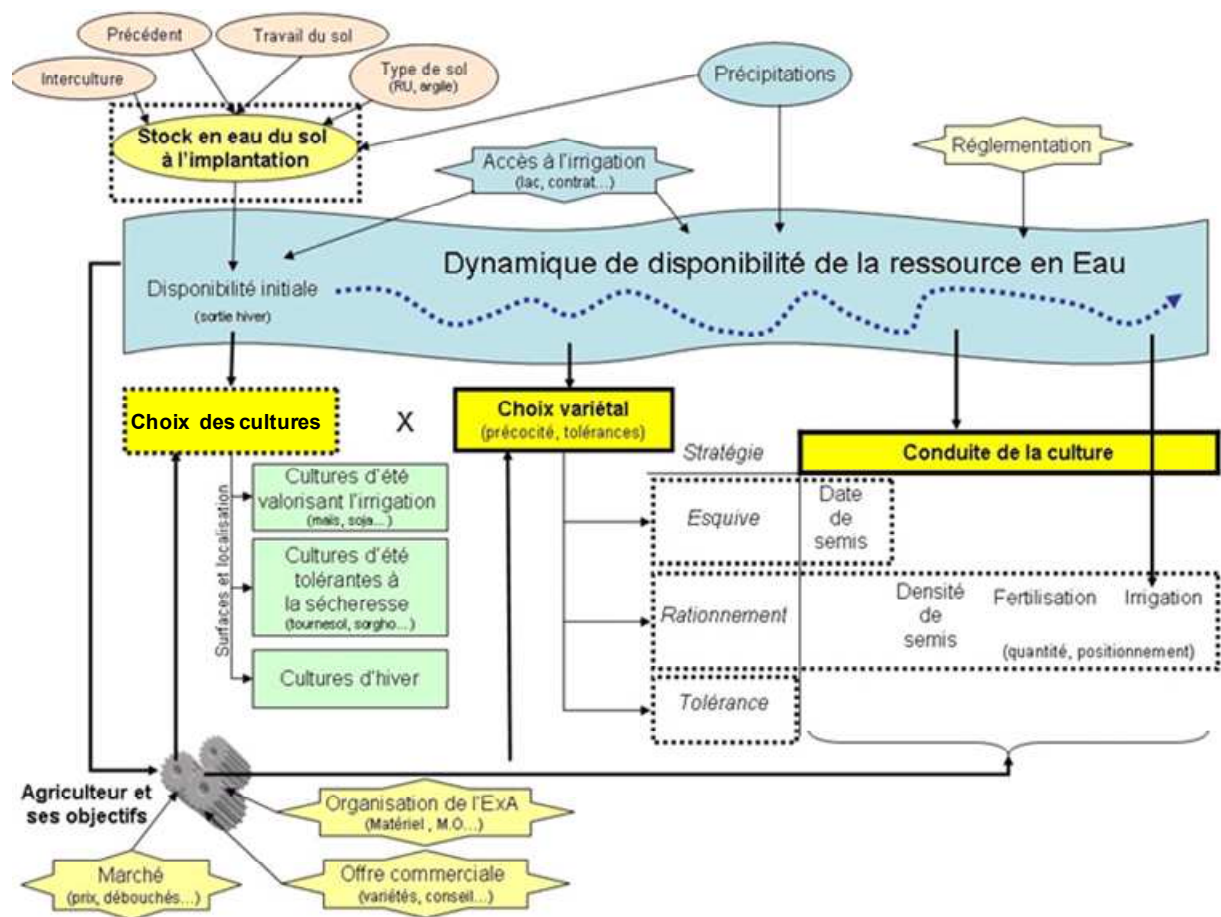


Figure 1 : Principales étapes du raisonnement des systèmes de culture contraints par une disponibilité en eau limitée (les encadrés en pointillés font références aux éléments du système sur lesquels peuvent s'appliquer les différentes stratégies possibles). D'après (Debaeke et Amigues, 2008).

Dans ce système complexe, il est possible d'agir :

- en stockant et conservant l'eau dans le sol,
- en optimisant le choix de la culture en fonction de la ressource,

- en combinant un choix variétal à une conduite de culture pour esquiver la sécheresse
- en réduisant les besoins en eau par une stratégie de rationnement.

Le grand nombre de combinaisons qu'il est possible de faire uniquement en modulant le choix variétal et la conduite de culture font de ces deux éléments du système des clés en termes de développement de nouvelles stratégies. La recherche doit donc se doter d'outils, agronomiques et génétiques, pour faciliter la mise en œuvre de conduites innovantes à travers la sélection de nouvelles variétés et l'évaluation de nouvelles conduites de cultures.

1.1.3 Outils d'aide à la sélection de variétés innovantes, à la conception et à l'évaluation de nouvelles conduites de culture

Le schéma de sélection classique, coûteux en temps et en argent, est aujourd'hui souvent remplacé par un schéma de sélection assisté par marqueurs appelé également sélection intelligente. Cette nouvelle pratique, apparue il y a une dizaine d'années avec l'utilisation du marquage moléculaire, permet d'accélérer et d'optimiser considérablement l'efficacité des programmes de sélection variétale. En effet, l'association entre des marqueurs moléculaires et des gènes d'intérêt agronomique permet d'estimer la valeur génétique d'un individu et de prédire ses performances uniquement par la caractérisation de son génotype, en s'affranchissant des méthodes classiques de phénotypage. Les marqueurs permettent donc de tester rapidement de nouvelles variétés et de ne retenir que celles qui possèdent les caractéristiques recherchées. Cette approche permet de réaliser de nouveaux croisements et de favoriser le brassage génétique en contrôlant les caractères d'intérêts. Cela permet une sélection multicaractère en aidant à accumuler dans un même génome plusieurs gènes d'intérêts.

L'évaluation de nouvelles variétés en conditions expérimentales *in situ* est une limite dans le processus de sélection et de validation de pratiques innovantes par les difficultés que cela représente tant au niveau temporel que logistique. La performance d'une variété s'exprime de façon différente en fonction des conditions environnementales (sol, climat, année) et de la conduite de la culture (date de semis, conduite azotée, irrigation). Cela nécessite donc une évaluation dans un grand nombre de conditions. L'identification de ces interactions entre un génotype et l'environnement, appelées interactions GxE, est primordiale dans l'évaluation d'une nouvelle variété associée à une conduite de culture innovante. L'utilisation de la modélisation comme outil d'aide à la décision dans les systèmes de culture constitue

aujourd'hui une alternative de plus en plus répandue. De plus, le développement d'un grand nombre de modèles de culture a été favorisé par des technologies informatiques de plus en plus puissantes.

Dans ce contexte de conception et d'évaluation de systèmes de culture innovants, nous nous proposons de traiter des stratégies envisageables au niveau du choix variétal et de la conduite de culture dans le cas du tournesol en région Midi-Pyrénées, plus particulièrement dans des situations d'avancée de la date de semis.

1.2 Présentation du tournesol

1.2.1 Historique de la culture

Le tournesol est originaire d'Amérique du nord où l'on trouve encore sa forme sauvage. Il y a été domestiqué il y a environ 4000 ans (Burke *et al.*, 2002(a)) et ne fut introduit en Europe qu'au XVI^e siècle comme plante ornementale. C'est à partir du XVIII^e siècle en Russie que le tournesol est utilisé et sélectionné comme plante oléagineuse, la plupart des variétés cultivées aujourd'hui en Amérique du Nord, du Sud ou en Afrique proviennent de Russie. Le tournesol ($2n=34$) appartient à la famille des Compositae (Astraceae), au genre *Helianthus*, à l'espèce *annuus*. C'est une grande plante (1,5 à 4 m de haut) annuelle en C3 qui possède un cycle de développement assez court de 120 à 150 jours. Son inflorescence ou capitule, de 15 à 40cm de diamètre, comporte environ 1500 fleurs autofertiles, à fécondation entomophile donnant autant de graines ou akènes constitués d'un péricarpe non soudé et d'une amande renfermant 40 à 50% d'huile.

Les principaux pays producteurs de tournesol sont la Russie, l'Ukraine et l'Argentine qui a eux trois représentent près de la moitié de la production mondiale (respectivement 23%, 16% et 13%). La Chine représente aujourd'hui 7% de la production mondiale devant la France, les Etats-Unis d'Amérique et l'Inde qui produisent chacun 5% du tournesol mondial (FAO). Le tournesol est cultivé pour sa composante majeure : l'huile de ses graines. Le tournesol représente également un apport de protéines végétales dont on se sert sous forme de tourteaux pour nourrir les animaux d'élevage une fois la majorité de l'huile extraite.

La France est le premier pays producteur d'huile de tournesol en Europe avec une production de 1,37 millions de tonnes et une surface cultivée de 534 000 ha en 2007 (FAO). La distribution géographique des cultures de tournesol en France reste limitée aux régions

Poitou-Charentes, Midi-Pyrénées, Pays de la Loire et Centre. Le tournesol est devenu la première graine oléagineuse transformée en France, c'est la quatrième huile consommée dans le monde. Le tournesol est surtout connu pour son huile alimentaire riche en acides gras essentiels (dont l'acide linoléique) et en vitamine E (puissant anti-oxydant).

Le tournesol oléique peut être estérifié, ainsi il s'ouvre progressivement au marché non alimentaire en remplaçant les matières issues du pétrole dans le secteur des biolubrifiants et, avec le développement des biocarburants, il complète la fabrication de biodiesel issu du colza.

1.2.2 Cycle de développement et technique culturale dans le sud-ouest

Dans la région Midi Pyrénées, un semis conventionnel de tournesol s'effectue début avril. Jusqu'à la mi-juin se déroule la phase végétative conditionnant la mise en place de la surface foliaire suivie la phase préfloraison qui dure jusqu'à la fin du mois de juin. La floraison a lieu généralement en juillet et dure en moyenne 7 à 10 jours. La maturité physiologique est atteinte vers le 20-25 août, et la récolte du tournesol peut se faire lorsque l'humidité du grain est de l'ordre de 11% au cours de la première décade de septembre (figure 2).

L'élaboration du rendement s'effectue tout au long du cycle, et dépend du nombre d'ébauches florales (mis en place durant l'initiation florale), du nombre d'akènes fécondés lors de la floraison et enfin du remplissage des akènes (remobilisation) (Merrien, 1992). Ainsi pour optimiser le rendement chacune de ces composantes doit être considérée. Le rendement potentiel varie globalement selon le type de sol de 18 à 35 q/ha.

Le tournesol est une tête d'assolement favorable aux céréales car il assure une rupture du cycle notamment vis-à-vis de certaines maladies des céréales comme la fusariose. De plus, il libère tôt le sol, le nettoie (plante étouffante et binée) et restitue au sol environ 7 tonnes de matières sèches soit environ 1,5 tonnes d'humus, et une partie de l'azote, du phosphore et du potassium qu'il a extrait du sol. Il est cultivé avec une densité moyenne de peuplement de 6 à 7 pieds par m². Dans la région Sud-Ouest, la part de la surface agricole utile consacrée au tournesol représente environ 25% d'une exploitation avec une rotation assez rapide en moyenne tous les 2 ans. L'irrigation du tournesol n'est pas courante mais, si elle a lieu, elle démarre au stade bouton floral (E1) et s'arrête au stade M2 (figure 2).

Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.
Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.

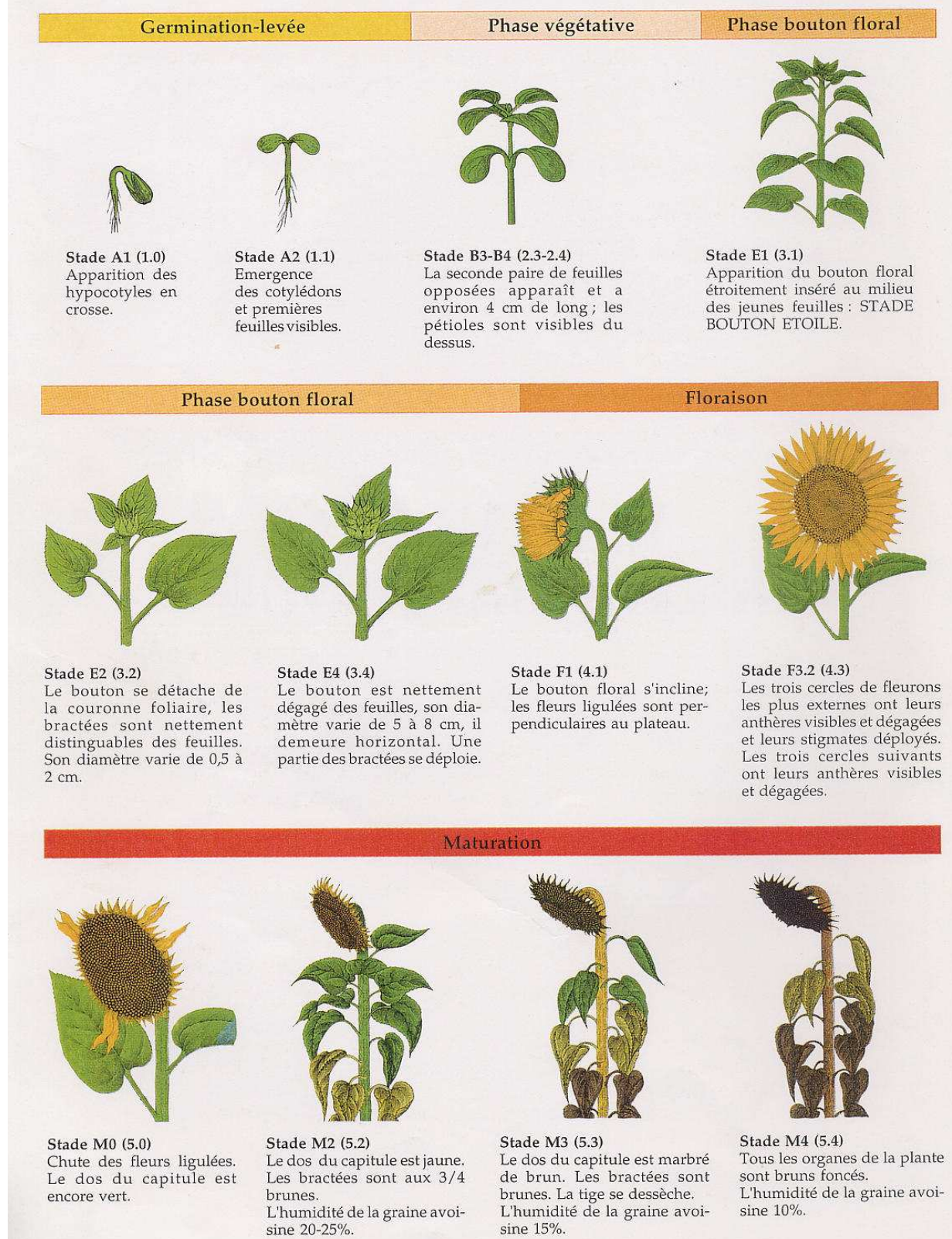


Figure 2 : Stades repères du développement du tournesol cultivé décrit par le CETIOM (CETIOM, 2002).

1.2.3 Augmenter la compétitivité de la culture du tournesol : le projet Tournesol 2010

Depuis une vingtaine d'années, la productivité du tournesol plafonne. Sous l'impulsion de la filière (sélectionneurs, producteurs), les acteurs du pôle toulousain se sont fédérés autour d'un projet commun : identifier les axes prioritaires qui permettraient d'améliorer le rendement et la teneur en huile de la culture. Ce projet « Tournesol 2010 » regroupe l'INRA (Institut national de la recherche agronomique), l'ENSAT (Ecole nationale supérieure agronomique de Toulouse), l'ESAP (Ecole supérieure d'agriculture de Purpan), le CETIOM (Centre d'Etude Technique Interprofessionnel des oléo protéagineux Métropolitains), l'ASEIS-SO (Association des semenciers du sud), SOFIPROTEOL (Etablissement financier de la filière française des huiles et protéines végétales) et la région Midi -Pyrénées. Cinq thèmes prioritaires de recherche ont été retenus : deux consacrés à l'amélioration du rendement sous contraintes abiotiques et trois à la résistance aux maladies. Dans le cadre de l'axe consacré à l'amélioration du rendement sous contraintes abiotiques, c'est surtout la sécheresse estivale qui constitue la contrainte majeure. En dépit de son bon comportement face à la sécheresse (enracinement profond, ajustement de la surface foliaire,...), il subsiste une importante fluctuation interannuelle du rendement et de la teneur en huile notamment lors de contraintes hydriques marquées au moment de la phase de la floraison qui détermine le nombre de graines par capitule.

1.2.4 Mise en place d'une stratégie d'esquive

Différentes stratégies agronomiques et génétiques ont été envisagées pour améliorer la productivité du tournesol en présence de contraintes thermiques et hydriques. Un programme a notamment été développé dans le cadre du projet « Tournesol 2010 » afin d'évaluer les possibilités d'une anticipation des dates de semis dans le but d'accroître la productivité et esquiver la contrainte hydrique. En effet, un semis anticipé d'environ un mois (semis en février ou mars au lieu d'avril ou mai tel qu'il est pratiqué en France (figure 3) permettrait :

- d'augmenter la durée potentielle du cycle végétatif soit l'accumulation de biomasse qui s'effectue principalement durant cette phase de développement,
- et d'éviter les périodes de déficits hydriques sévères lors de la floraison, étape essentielle dans l'élaboration du rendement.

Le semis conventionnel est effectué lorsque les températures sont voisines de 15°C, (figure 3). En avançant d'un à deux mois la date de semis, les plantes seraient soumises à de plus faibles températures surtout lors de la phase « germination levée » et des premiers stades de la croissance végétative. Ces basses températures en début de cycle constituent donc un obstacle à la mise en œuvre de semis précoces et leurs conséquences sur la culture de tournesol nécessitent d'être explorées.

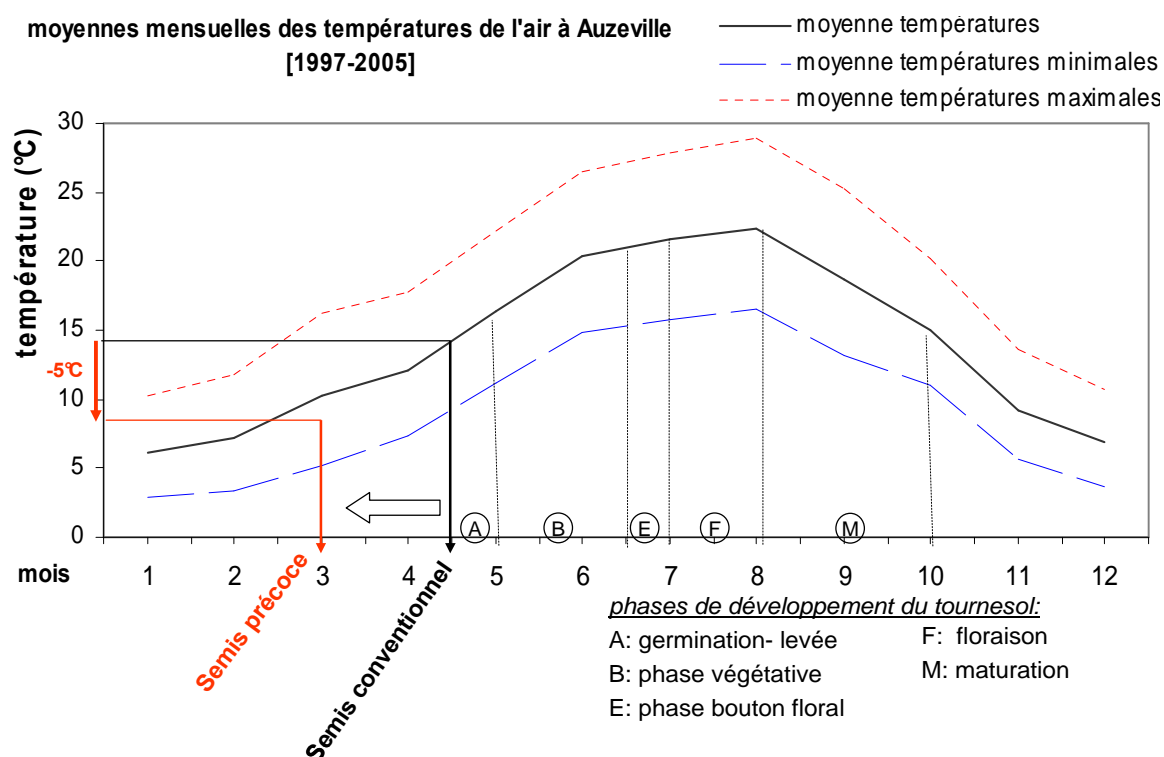


Figure 3: Phases de développement du tournesol pour un semis mi-avril et évolution des températures moyennes journalières. Visualisation de l'abaissement des températures sous l'effet d'un semis anticipé. Mesures réalisées à la station météorologique d'Auzeville (moyenne 1997-2005).

1.3 Objectif et démarche de la thèse

Dans le cas de la culture du tournesol, la mise en place d'une stratégie d'esquive de la sécheresse semble pouvoir répondre aux enjeux liés à l'élaboration d'itinéraires techniques durables, raisonnés en fonction de la disponibilité en eau. La stratégie d'esquive peut s'envisager par un semis précoce (qui induira des températures basses en début de cycle) et par le choix d'une variété adaptée à cette conduite de culture (précocité, tolérance aux basses températures).

Dans ce contexte, il est nécessaire au préalable de disposer d'outils d'aides au choix variétal, à la sélection variétale et à l'évaluation de conduites techniques. L'objectif finalisé de ce travail de recherche consiste donc à fournir ces outils en :

- **1) contribuant au développement d'un modèle de culture (SUNFLO) pour l'évaluation de nouveaux itinéraires techniques (date de semis précoce et choix variétal) à travers l'analyse des interactions génotype/environnement/conduites de culture en condition de semis précoces,**
- **2) permettant ainsi d'identifier des idéotypes innovants adaptés aux conditions de semis précoces**
- **3) proposant des indicateurs agro morphologiques et physiologiques ainsi que les marqueurs moléculaires associés à la tolérance au froid chez le tournesol pour aider à la sélection de génotypes innovants**

Pour cela, nous nous proposons dans un premier temps d'évaluer le modèle SUNFLO en conditions de semis précoces et si nécessaire de proposer des améliorations dans son formalisme afin d'étendre son domaine de validité aux conditions de semis précoces. Après avoir validé la qualité prédictive du modèle SUNFLO, nous l'utiliserons pour évaluer des « idéotypes » virtuels en conditions de semis précoces dans le cas de différentes séries climatiques et ainsi d'identifier le type variétal le mieux adapté à cette nouvelle pratique, ainsi que la meilleure adéquation entre le choix variétal et la date du semis. Dans un second temps, nous chercherons à caractériser l'effet des basses températures sur les traits agro morphologiques (identifiés dans le modèle SUNFLO) puis à identifier des indicateurs physiologiques (impliqués dans la réponse des plantes au froid) constituant des caractères d'intérêts pour la sélection de variétés performantes en semis précoces associés à des basses températures en début de cycle. L'étude de la variabilité génétique de ces caractères agro morphologiques et physiologiques à basses température, en plus de la détermination des plages de variation des valeurs des paramètres du modèle, permettra également la recherche des régions génomiques impliquées dans la variation de ces caractères et d'identifier des marqueurs moléculaires d'intérêts pour la sélection.

2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Modélisation dynamique d'un peuplement cultivé

2.1.1 Modélisation de la phase de croissance hétérotrophique

La phase de croissance hétérotrophique se compose de deux processus physiologiques distincts: la germination et la croissance de l'hypocotyle et de la racine. Ces deux processus dépendent en grande partie de la température, même si la statut hydrique joue également un rôle important (Alvarado et Bradford, 2002). Les modèles écophysiologiques qui se sont intéressés à la représentation de cette phase de croissance ont été principalement développés à partir de sous modèles décrivant chacun un processus physiologique en fonction de la température (Blacklow, 1972; Wanjura *et al.*, 1970). La relation entre la vitesse de germination et la température a souvent été décrite par un modèle linéaire (Moot *et al.*, 2000; Steinmaus *et al.*, 2000). La vitesse d'élongation de l'hypocotyle a également été décrite par une fonction linéaire du temps (Hatfield et Egli, 1974; Wheeler et Ellis, 1991). La régression linéaire présente l'avantage de pouvoir déterminer facilement un paramètre clé souvent discuté dans la littérature, la température de base « Tb » (de germination ou de croissance de l'hypocotyle). La température de base Tb (en °C) se calcule à partir des deux paramètres b_0 et b_1 de la régression linéaire décrite par l'équation 1 où v est la vitesse (en j^{-1}) du processus physiologique (germination ou croissance) et T la température (en °C) (Angus *et al.*, 1980).

$$v = b_0 + b_1 T \quad (\text{équation 1}) \quad \text{et} \quad Tb = \frac{-b_0}{b_1}$$

La température de base est un paramètre important puisqu'il entre en compte dans le calcul du temps thermique (degré jour ou °Cj) à la base de tous les modèles décrivant la croissance selon l'équation 2 où v est la vitesse (en j^{-1}) du processus physiologique (germination ou croissance), T la température moyenne de l'air (en °C), Tb la température de base (en °C) et θ le temps thermique (en °Cj) (Benech-Arnold et Sanchez, 1995).

$$v = \frac{T - Tb}{\theta} \quad (\text{équation 2})$$

Mais plusieurs auteurs ont montré que dans le cas de la germination, cette relation linéaire n'était pas toujours valide, notamment pour les basses températures où le modèle linéaire sous-estime la vitesse de germination (Adam *et al.*, 2007; Angus *et al.*, 1980; Demmig-Adams et Adams III, 1996; Marshall et Squire, 1996). Angus *et al.* (1980) ont montré qu'en

fonction de la gamme de températures à partir de laquelle l'ajustement pour estimer T_b était réalisé, les valeurs de T_b étaient très différentes (figure 4).

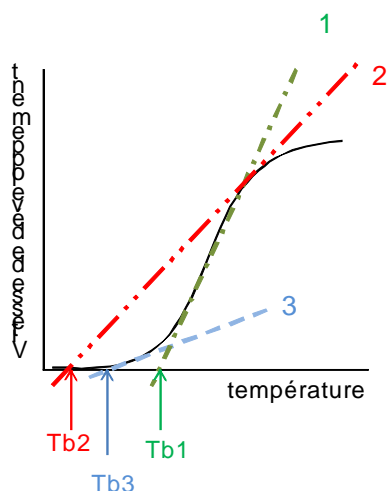


Figure 4 : Représentation des différentes réponses possibles de la vitesse de développement en fonction de la température induisant chacune une température de base (T_b) spécifique. L'ajustement 1 représente une méthode d'estimation de T_b en extrapolant à partir d'une large gamme de température. L'ajustement 2 donne une valeur dépendante de la température de base T_b estimée à partir de températures élevées, et l'ajustement 3 propose une méthode d'estimation de T_b dans le cas de basses températures (d'après Angus *et al.*, 1980).

Yin et al (Yin *et al.*, 1995) ont proposé un modèle non linéaire, basé sur une fonction bêta, pour représenter la relation entre germination et température. Cette fonction utilise cinq paramètres et permet l'estimation d'une température de base de germination.

La représentation de la phase de croissance hétérotrophique, incluant la germination et la croissance de l'hypocotyle et de la racine, se fait donc le plus souvent par l'utilisation de modèles linéaires. Voyons maintenant comment est représentée la phase de croissance autotrophique.

2.1.2 Modélisation de la phase de croissance autotrophique

Dès que l'acquisition de l'autotrophie est effective, le peuplement végétal peut être assimilé à un système biophysique captant de l'énergie lumineuse via sa surface foliaire et produisant de la biomasse à partir de cette énergie lumineuse (Lecoeur et Guillioni, 2005). La production de biomasse de toute culture résulte du processus de photosynthèse qui permet la fixation du gaz carbonique de l'atmosphère grâce à l'énergie solaire captée par les feuilles. L'élaboration du potentiel de production dépend de la quantité d'énergie solaire disponible, de la capacité de la culture à capter cette énergie, de la capacité de la culture à transformer cette énergie en biomasse et de la conversion de cette biomasse en graines. Monteith (Monteith, 1972; Monteith, 1977) fut le premier à proposer une analyse énergétique de la production de biomasse, formalisée par l'équation 3 où MS représente la matière sèche produite entre les temps t_1 et t_2 , R_g le rayonnement global solaire incident sur la culture, ϵ_i l'efficacité

d'interception du rayonnement, ε_b l'efficacité de transformation du rayonnement en biomasse, ε_c l'efficacité climatique (partie du rayonnement global utilisable pour la photosynthèse) :

$$MS = \int_{t_2}^{t_1} \varepsilon_b \cdot \varepsilon_i \cdot \varepsilon_c \cdot R_g \cdot dt \quad (\text{équation 3})$$

En l'absence de contrainte hydrique, minérale ou biotique, le rayonnement solaire est la principale limite physique au rendement d'une culture. Dans le rayonnement solaire global incident (R_g) seules les longueurs d'ondes utiles à la photosynthèse (400-700nm) ou PAR_0 , participent à la production de biomasse. La fraction du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR_0) dans le rayonnement global est appelée efficacité climatique (ε_c). Elle est pratiquement constante dans les conditions naturelles et est égale à 0,48. Il est alors possible d'exprimer la production de biomasse selon l'équation 4 où MS représente la matière sèche produite entre les temps t_1 et t_2 , ε_i l'efficacité d'interception du rayonnement, ε_b l'efficacité de transformation du rayonnement en biomasse, et PAR_0 le rayonnement photosynthétiquement actif incident.

$$MS = \int_{t_2}^{t_1} \varepsilon_b \cdot \varepsilon_i \cdot PAR_0 \cdot dt \quad (\text{équation 4})$$

L'efficacité d'interception (ε_i) du rayonnement dépend de la surface et de l'architecture foliaires de la plante (organogenèse, morphogenèse et sénescence). L'efficacité biologique (ε_b) dépend principalement de l'activité photosynthétique (Lecoeur et Guillioni, 2005). Le formalisme de Monteith, avec ces deux caractères intégratifs (ε_i , ε_b), est à la base de la plupart des modèles, décrivant le fonctionnement des cultures, développés et utilisés aujourd'hui en agronomie.

2.1.3 Modèle de culture et modélisation des interactions génotype X environnement

2.1.3.1 Définition d'un modèle de culture

Un modèle de culture est un modèle mathématique qui décrit la croissance et le développement d'une culture en interaction avec l'environnement (Wallach, 2006). Les modèles de culture décrivent le fonctionnement d'un système de culture le plus souvent de façon dynamique, c'est-à-dire en intégrant au cours du temps sa propre évolution. Dans ce cas ils sont constitués de variables d'entrées, de paramètres, de variables d'états et de variables de

sorties. Les variables d'entrées décrivent les conditions du système tels que les états initiaux du sol, la météo journalière (rayonnement global, températures minimales et maximales, pluviométrie, l'itinéraire technique). Les paramètres constituent les constantes des équations mathématiques utilisées. Les variables d'états (ou exploratoires) décrivent l'évolution du système au cours du temps. Les variables de sorties constituent le résultat de la simulation, final ou intermédiaire. Les variables d'états et les paramètres du modèle constituent les termes de l'équation mathématique décrivant le modèle. La variable d'état est mesurée ou observée (ou basée sur une valeur mesurée ou observée) pour chaque situation où le modèle est appliqué tandis que le paramètre est stable quelles que soient les conditions d'utilisation.

Les équations mathématiques (ou formalisme) utilisées dans un modèle peuvent décrire les processus physiologiques à l'origine de l'évolution du système au cours du temps : on parlera de modèle mécaniste. Mais elles peuvent également décrire la relation entre deux processus et se placer à une échelle de description plus intégratrice : on parlera de modèle empirique (Monteith, 1996; Whisler *et al.*, 1986). La description d'un système en utilisant ces deux types de modèles mathématiques est une alternative couramment utilisée dans les modèles de culture qui décrivent un grand nombre de mécanismes dynamiques et sont appelés modèles fonctionnels (Brisson *et al.*, 2003). Ces modèles comme EPICphase (Cabelguenne *et al.*, 1999), ou STICS (Brisson *et al.*, 2003) sont des modèles de culture génériques développés pour simuler la croissance et le développement de plusieurs types de cultures, notamment le tournesol.

2.1.3.2 Le modèle SUNFLO

Plusieurs modèles de type fonctionnel ont été développés pour représenter spécifiquement la culture du tournesol (Pereyra-Irujo et Aguirrezábal, 2007; Villalobos *et al.*, 1996). Ils se basent principalement sur une approche intégratrice de production de biomasse selon le formalisme de Monteith décrit précédemment. Mais ces différents modèles n'ont pas particulièrement été conçus pour prendre en compte la réponse de différents génotypes à des conditions environnementales variées. En effet, le phénotype observé pour une variété donnée dépend de son génotype (caractéristiques génétiques) mais aussi de l'effet de l'environnement sur celui-ci. Dans des environnements contrastés, le génotype ne va pas forcément s'exprimer de la même façon, donnant pour une même variété des phénotypes différents : c'est ce qu'on appelle une interaction génotype - environnement. L'étude de variétés de tournesol issues de

plusieurs années de sélection a permis d'évaluer et de quantifier la variabilité génétique à l'origine d'interactions avec différents environnements (Debaeke *et al.*, 2003). Grâce à l'identification de ces interactions génotype –environnement, il a été possible de construire un modèle de culture du tournesol, permettant de représenter les interactions génotype-environnement-conduite technique, intitulé SUNFLO (Casadebaig, 2008). Ce modèle prend en compte la variabilité génétique à travers une série de paramètres génotypiques qui ont pour but de faire le lien entre phénotype et génotype. Dans SUNFLO, les paramètres génotypiques correspondent à des paramètres spécifiques pour chaque variété (en termes de phénologie, morphologie ou physiologie) et permettent de reproduire le comportement variétal dans un environnement donné : c'est l'originalité de ce modèle : relier un phénotype complexe (rendement) à un ensemble de caractéristiques variétales mesurables (Casadebaig, 2008).

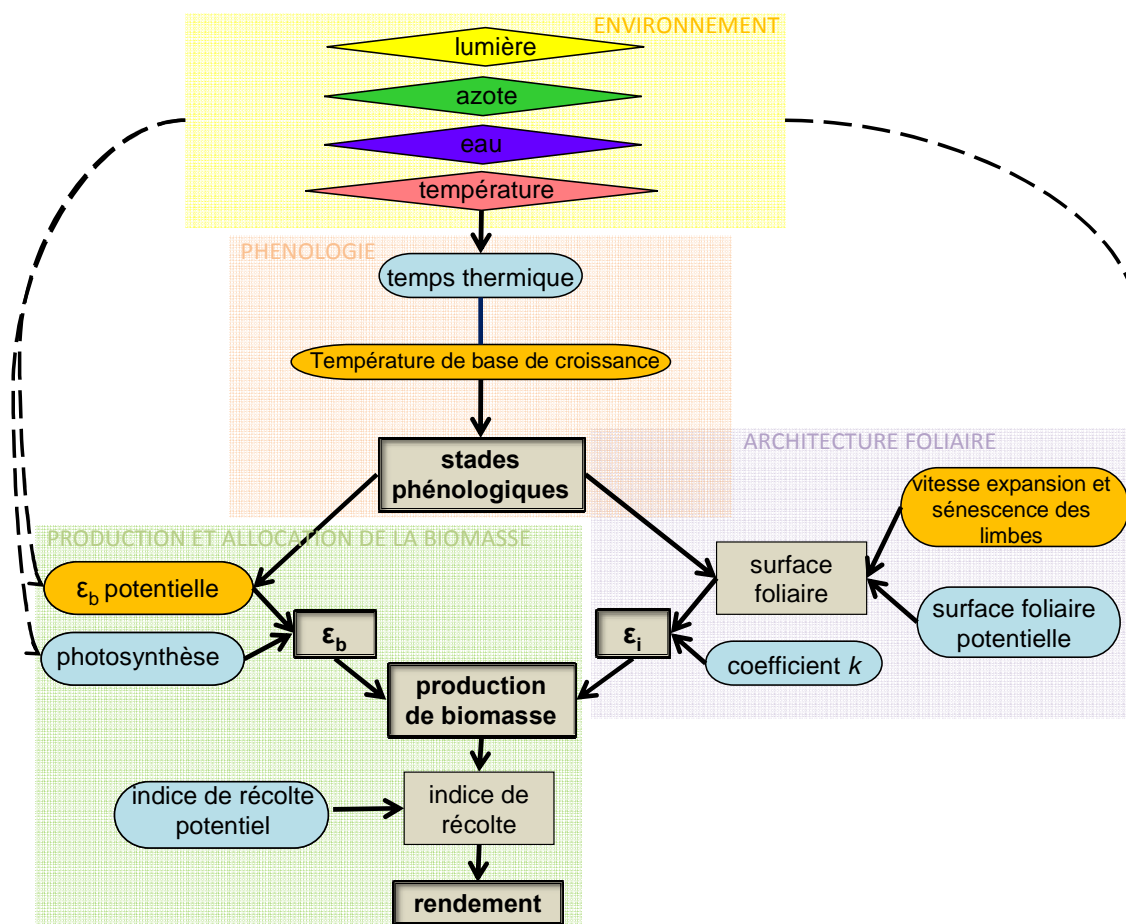


Figure 5 : Représentation des différents modules du modèle de culture SUNFLO : phénologie, architecture foliaire et interception lumineuse, production et allocation de la biomasse et environnement. Les variables de sorties (finales et intermédiaires) sont représentées dans les rectangles et les paramètres dans les bulles (bleues pour les paramètres génotypiques et orange pour les paramètres non génotypiques). Les flèches en pointillé représentent l'action des stress potentiels (température, hydrique, azote, lumière) sur les paramètres du modèle.

l'allocation de la biomasse vers les grains et l'environnement. Les principaux paramètres et variables pour chaque module sont résumés par la figure 5. Un module peut être défini comme un sous ensemble d'équations du modèle dont les entrées et les sorties ont fait l'objet d'observations dans des essais expérimentaux.

Phénologie

Les stades phénologiques utilisés dans le modèle pour caractériser le développement de la culture depuis le semis (A0) sont : la levée (A2), le stade d'apparition du bouton floral (E1), le début de la floraison (F1), la fin de la floraison (M0) et la maturité physiologique de la culture (M3). La représentation de la phénologie est basée sur un modèle temps thermique décrit plus en détail au chapitre 2.1.3.4.1. Le temps thermique pour atteindre chaque stade de développement est un paramètre génotypique du modèle qui a été caractérisé pour chaque variété. A partir de la variable d'entrée « température journalière », le modèle peut prédire pour chaque condition les dates des stades phénologiques (en jours calendaires ou jours juliens noté « jj » qui correspondent au nombre de jours depuis le premier janvier de l'année).

Architecture foliaire et efficacité d'interception

La mise en place et l'expansion de la surface foliaire au cours du développement de la culture conditionne la quantité de lumière interceptée par le couvert soit l'efficacité d'interception ϵ_i . L'équation mathématique qui rend compte de l'évolution de la surface foliaire dans le modèle est complexe et ne sera pas énoncée ici. Mais ce formalisme présente l'avantage d'utiliser des paramètres relatifs à l'expansion et à la sénescence des limbes (figure 5) faciles à mesurer. L'évolution de la surface foliaire au cours du temps dépend donc de ces paramètres communs à tous les génotypes (non génotypiques) mais aussi de caractéristiques architecturales génotypiques. Le paramétrage variétal nécessite la mesure des paramètres génotypiques suivants : nombre total de feuilles (NF), position (n_{SFmax}) et surface (SFmax) de la plus grande feuille. L'évolution de la surface foliaire active de chaque variété (en m²) est ensuite transformée en indice de surface foliaire (en m² de surface foliaire par m² de sol), le LAI.

L'efficacité d'interception du couvert est simulé dans SUNFLO à partir du LAI par la loi de Beer selon l'équation 5 (Monsi et Saeki, 2005).

$$\epsilon_i = \epsilon_{i,max} (1 - e^{-k.LAI}) \quad (\text{équation 5})$$

Le rayonnement est atténué au fur et à mesure de sa progression dans le couvert végétal en raison de son interception par les feuilles. Les feuilles du bas du couvert reçoivent donc moins de rayonnement que les feuilles du haut, ce qui dépend, pour une densité de peuplement donné, de l'architecture de la plante (type parasol ou sapin) et de l'inclinaison des feuilles c'est-à-dire de l'angle que fait le pétiole avec la tige. Ces caractéristiques architecturales sont définies pour chaque variété par un coefficient d'extinction du rayonnement, appelé aussi coefficient k , qui constitue dans le modèle un paramètre génotypique stable au cours du cycle (Debaeke *et al.*, 2003). L'efficacité d'interception ϵ_i décroît donc dans le couvert de façon exponentielle en fonction du LAI et d'un coefficient d'extinction du rayonnement k . L'efficacité d'interception maximale ($\epsilon_i \text{ max}$) est égale à 1 dans le formalisme du modèle.

Production et allocation de la biomasse

L'évolution de la production de biomasse au cours du temps est simulé dans le modèle via le formalisme de Monteith décrit précédemment (Monteith, 1972) c'est-à-dire à partir de l'efficacité biologique et de l'efficacité d'interception du rayonnement. L'efficacité biologique simulée tient compte d'un paramètre génotypique : la photosynthèse maximum relative, et d'un paramètre non génotypique : l'efficacité biologique potentielle (figure 5). L'efficacité biologique potentielle qui est un paramètre constant pour toutes les variétés, a été paramétrée à partir d'une variété référence, la variété Mélody. Elle est modulée dans le modèle en fonction des stades phénologiques (figure 6). Du semis à 200°Cj, elle est constante, croissante en fonction du temps thermique jusqu'à la floraison, stable pendant la floraison puis décroissante de façon exponentielle jusqu'à la maturité. Comme l'efficacité biologique potentielle dépend des stades de développement, son évolution au cours du temps varie d'une variété à l'autre par la prise en compte des paramètres génotypiques relatifs à la phénologie. Le formalisme mathématique de SUNFLO tient compte également de trois facteurs affectant l'efficacité biologique potentielle : les stress hydrique, azoté et thermique.

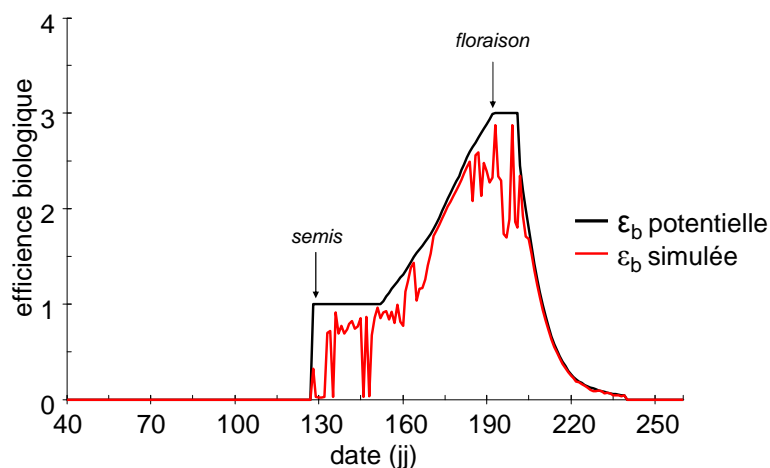


Figure 6: évolution de l'efficacité biologique au cours du cycle de développement tel qu'il est prit en compte dans le modèle SUNFLO

L'allocation de la biomasse vers les akènes est formalisée dans SUNFLO par le biais de l'Indice de Récolte (IR) plutôt que par une approche utilisant les composantes du rendement. Selon Chapman *et al.* (1993) l'indice de récolte est défini comme le ratio entre la biomasse des grains et la biomasse aérienne totale. L'algorithme utilisé dans SUNFLO pour simuler l'IR est une fonction du temps thermique bornée par un indice de récolte maximal potentiel (IRg) spécifique de la variété (figure 5).

Le rendement qui constitue la variable majeure de sortie du modèle est déduit de l'IR. Le rendement (RDT, en considérant les grains propres et secs donc 0% d'humidité et 0% d'impureté) correspond au produit de l'IR avec la biomasse aérienne produite par m² de surface converti en q/ha.

Composantes environnementales

Le modèle simule la quantité d'eau disponible pour la culture à différentes phases de son cycle en représentant les flux d'eau entre le sol et la plante. Le modèle utilisé tient compte de la représentation du sol, d'un bilan hydrique, de l'enracinement et de l'incidence du déficit hydrique sur la croissance et la consommation en eau (Casadebaig, 2008). Il en résulte trois variables de sortie qui correspondent à des facteurs de stress multiplicatifs sur l'expansion foliaire (FHLE), la transpiration (FHTR) et sur l'efficacité biologique à travers la photosynthèse (FHRUE). Le modèle détermine également une variable appelée indice de stress hydrique (ISH), qui définit le nombre de jours de stress hydrique pour trois périodes : pendant la croissance végétative (du semis à la floraison), pendant la floraison et pendant le remplissage du grain (de la floraison à la maturité).

La modélisation du bilan azoté prend en compte comme variable d'entrée la quantité d'azote minéral dans le sol, c'est-à-dire des reliquats azotés dans l'horizon de surface (fonction de la minéralisation de l'azote organique) et de la fertilisation. La minéralisation et la dénitrification sont représentées par des fonctions spécifiques. L'absorption d'azote par le couvert dépend de la quantité d'azote disponible (déterminée par le bilan azoté) et de la demande de la plante.

Prise en compte de la température et des contraintes thermiques

Le modèle SUNFLO est basé sur un modèle de temps thermique où la température efficace de croissance (calculée en soustrayant la température de base de croissance à la température moyenne journalière) est intégrée au cours du temps (Ritchie et Smith, 1991). La température de base (T_b) utilisée ici est de 4.8°C et correspond à la température de base d'initiation foliaire, de division et d'expansion cellulaire établie chez le tournesol par (Granier et Tardieu, 1998). Dans le modèle elle est considérée comme fixe depuis le semis ce qui inclut la phase « semis levée ». Elle est également considérée comme un paramètre non génotypique c'est-à-dire identique pour toutes les variétés. Les modèles de cultures déjà développés sur le tournesol considèrent également des températures de bases constantes pour toutes les phases de croissance, mais cette température de base varie d'un modèle à l'autre. Ainsi Chapman *et al.* ont utilisé une température de base de 8°C, (Chapman *et al.*, 1993) alors que la température de base utilisée dans deux autres modèles est de 6°C (Cabelguenne *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1993; Pereyra-Irujo et Aguirrezábal, 2007). Les températures de base relatives aux processus de levée (germination et élongation de l'hypocotyle) ainsi qu'à la croissance végétative n'ont jusqu'à maintenant jamais été clairement établies chez le tournesol.

Le formalisme pour simuler le temps thermique nécessaire à la phase semis-levée ($A0A2$, en jours) est issu du modèle de Villalobos *et al.* (1996). Il prend en compte les processus de germination et d'élongation de l'hypocotyle ainsi que la profondeur du semis selon l'équation 6 où $A0$ correspond au temps thermique nécessaire pour la germination (°Cj), vEH la vitesse d'élongation de l'hypocotyle (°C/mm) et $zSemis$ la profondeur du semis (mm)

$$A0A2 = A0 + vEH \times zSemis \quad (\text{équation 6})$$

Dans ce formalisme A0 et vEH sont des constantes égales respectivement à 86°Cj et 1.19°Cj/mm (Villalobos *et al.*, 1996). La température de base de croissance étant la même pour toutes les variétés, le modèle ne prend pas en compte la variabilité génotypique pour simuler la levée.

Le formalisme du modèle pour représenter la phénologie à partir de la levée est décrite par l'équation 7 où TT_j représente le temps thermique au jour j (°Cj), T_m la température moyenne de l'aire (°C), T_b la température de base de croissance (°C) et AP un facteur d'accélération phénologique (°C) lié à la contrainte hydrique.

$$\text{si } T_m > T_b \quad TT_j = \int_0^j (T_m - T_b) + AP \cdot dt \quad \text{sinon } TT_j = 0 \quad (\text{équation 7})$$

Le facteur d'accélération phénologique (AP) est lié à la contrainte hydrique, via la réduction de la transpiration qu'elle induit et qui cause un échauffement de la plante. Cet échauffement peut avoir un effet accélérateur du développement selon son importance. Dans le modèle, cet effet est pris en compte en modifiant le calcul du temps thermique lors d'une contrainte : l'échauffement (AP) est linéairement croissant avec la fonction de réduction de la transpiration (FHTR).

Effet de la température sur la croissance végétative

Le formalisme qui explicite l'incidence de la température sur la photosynthèse du tournesol est issu des travaux de (Horie, 1977). Dans ces travaux, une courbe en cloche illustre comment l'efficacité de la photosynthèse diminue plus on s'écarte d'une température optimale. Cette courbe permet de déterminer deux températures optimales pour la photosynthèse : les températures optimales inférieure et supérieure. Les valeurs de ces températures ont été déterminées dans le cadre d'une expérimentation en serre (Casadebaig, 2004), où l'activité photosynthétique a été mise en relation avec la température de la feuille. Les valeurs de ces deux paramètres sont de 20°C pour la température optimale inférieure (T_{opt1_PHS}) et de 28°C pour la température optimale supérieure (T_{opt2_PHS}). Un troisième paramètre relatif à l'activité photosynthétique en relation avec la température, la température maximale pour la capacité photosynthétique (T_{max_PHS} paramétrée à 37°C) a également été déterminée (Casadebaig, 2004). SUNFLO évalue l'effet de la température sur la croissance dans le cas où la température moyenne est hors de la gamme des trois températures :

maximale, optimale supérieure et optimale inférieure. L'activité photosynthétique est alors réduite en fonction de la température. SUNFLO définit un facteur de stress thermique formalisé selon l'équation 8 où T_b est la température de base de croissance (°C), T_{opt1_PHS} la température optimale inférieure (°C), T_{opt2_PHS} la température optimale supérieure (°C), T_{max_PHS} température maximale pour la capacité photosynthétique (°C) et T_{moy} la température moyenne (°C)

(équation7)

$$FT = \begin{cases} 0 & \text{Si } T_{moy} < T_b \text{ et } T_{moy} > T_{max_PHS} \\ T_{moy} \left[\left(\frac{1}{T_{opt1_PHS} - T_b} \right) - \left(\frac{T_b}{T_{opt1_PHS} - T_b} \right) \right] & \text{Si } T_{moy} < T_{opt1_PHS} \\ T_{moy} \left[\left(\frac{1}{T_{opt2_PHS} - T_{max_PHS}} \right) - \left(\frac{T_{max_PHS}}{T_{opt2_PHS} - T_{max_PHS}} \right) \right] & \text{Si } T_{moy} > T_{opt2_PHS} \end{cases}$$

C'est ce facteur de stress thermique qui permet de rendre compte de l'effet des basses températures sur la croissance et le développement.

Le modèle SUNFLO a été développé pour des semis conventionnels, mais pas pour des conditions de « semis précoces » sous contraintes de basses températures. Il est également important de souligner que le formalisme actuel du modèle (et le paramétrage associé) ne permet pas de rendre compte de différences génotypiques observées au niveau de la durée de la phase « semis – levée » (Allinne, 2006), autrement dit, jusqu'alors, la variabilité génétique des principales variables qui caractérisent la phase semis-levée, n'a pas été étudiée et donc prise en compte dans la modélisation. La tolérance au froid ainsi que les capacités d'adaptation des génotypes aux basses températures sont peu décrites dans la littérature chez le tournesol. Dans une perspective de modélisation des interactions entre les génotypes et les semis précoces chez le tournesol, il s'avère nécessaire d'évaluer les formalismes du modèle SUNFLO pour des semis précoces, mais également d'analyser plus spécifiquement les processus physiologiques affectés par les basses températures. Cette analyse de processus physiologiques clés vise également à identifier des indicateurs d'évaluation de la variabilité génotypique de la tolérance au froid du tournesol.

2.2 Modifications physiologiques induites par les basses températures

2.2.1 Fonctionnement physiologique à basses températures

2.2.1.1 Tolérance vs acclimatation

Les espèces végétales présentent une large gamme de réponses en condition de stress thermique froid. Ces réponses dépendent d'une part des caractéristiques du stress : de son intensité (température négative ou positive), de sa durée (quelques heures, jours, mois...), de sa fréquence et de son interaction avec d'autres stress biotiques ou abiotiques (maladies, ravageurs, déficit hydrique...). D'autre part, ces réponses dépendent de la capacité des plantes à tolérer le froid. La tolérance intrinsèque, résulte du potentiel d'adaptation de l'espèce acquise au cours de l'évolution (qui dépend le plus souvent de l'origine géographique et climatique : tempérée, tropicale, montagnarde...) chez les populations naturelles, et également de la sélection variétale chez les espèces cultivées. Par exemple, sous un climat tempéré, des espèces d'origine tropicale comme le sorgho ou le maïs (Fracheboud *et al.*, 2004; Knoll *et al.*, 2008; Moll et Steinback, 1986) sont semées au printemps et présentent une capacité d'adaptation au froid moins importante que le blé semé à l'automne qui peut supporter de passer l'hiver à un stade végétatif (Groom et Baker, 1992). Il existe également une variation au sein d'une espèce mais aussi à l'échelle de la plante en fonction de son stade de développement et des organes.

En fonction de cette capacité de tolérance au froid Pearce (Pearce, 1999) a divisé les espèces de plantes en trois catégories (figure 7): les plantes sensibles aux basses températures qui subissent des dommages dès 12°C (espèces sauvages d'origine tropicale et subtropicale), les plantes tolérantes aux basses températures positives mais qui ne survivent pas au gel (climat tempéré), et les plantes capables de s'acclimater pour survivre à des températures largement inférieures à zéro degré (espèces montagnardes et de climat continental).

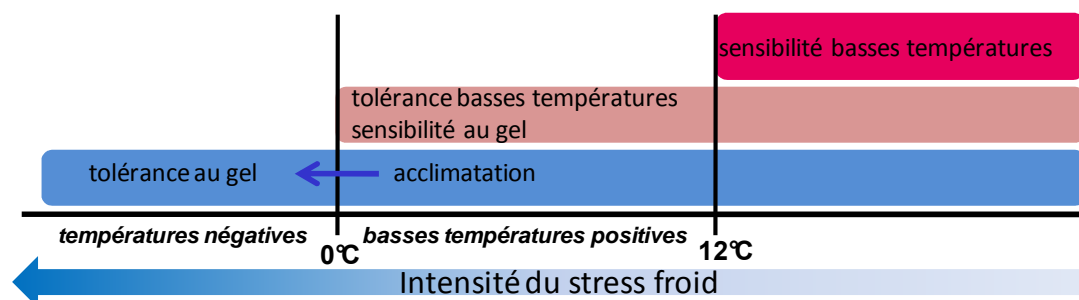


Figure 7 : Les différentes catégories de réponses possibles aux basses températures en fonction de l'intensité du stress froid.

L'acclimatation au froid met en jeu un grand nombre de mécanismes physiologiques permettant aux végétaux de mieux supporter un stress sévère (températures négatives) après une période plus ou moins longue à basse température (Xin et Browse, 2000). Le phénomène d'acclimatation induit des modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires associées à la mise en place de la tolérance au gel (Xin et Browse, 2000). Les basses températures positives et le gel sont des stress thermiques froids de natures différentes. Les basses températures ont des effets directs sur les cellules, tandis que le gel agit de façon indirecte en endommageant les cellules par déshydratation (Pearce, 1999). Les processus décrits ultérieurement ne prendront en compte que les modifications induites par des températures froides positives.

2.2.1.2 Evénements primaires de réponse

Le stress induit par des basses températures provoque chez les végétaux des réponses immédiates au niveau de l'équilibre cellulaire appelé événements primaires (Kacperska, 2004).

Froid et photosynthèse

La photosynthèse se déroule en deux phases distinctes : la phase photochimique durant laquelle l'énergie lumineuse est captée puis transformée en ATP, et le cycle de Calvin qui correspond à la phase de fixation du carbone et permet la synthèse de sucre. Le froid affecte la phase photochimique en réduisant la capacité de transfert des électrons via la chaîne de transporteur d'électrons principale (la protéine membranaire plastoquinone) (figure 8). Le froid réduit également la fixation du carbone lors du cycle de Calvin qui s'effectue par le biais de réactions biochimiques dont l'activité diminue avec la température (Esmiger et al, 2006).

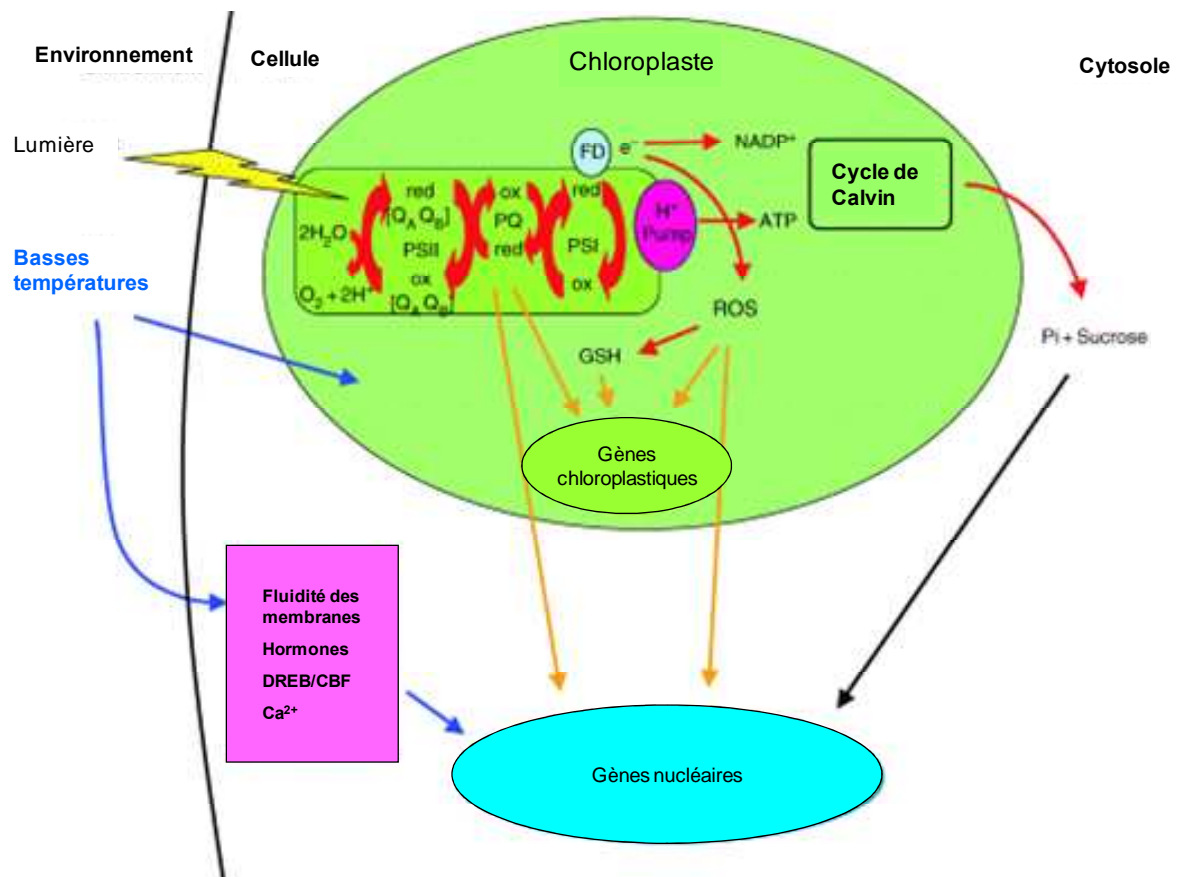


Figure 8: Schéma du processus de la photosynthèse et de sa régulation par les basses températures. Les flèches rouges indiquent le flux d'énergie, les flèches bleues indiquent la voie de perception des basses températures, les flèches oranges indiquent la voie de signalisation redox/H₂O₂ dépendante, et les flèches noires la voie de signalisation des sucres. Abréviation : photosystème II : PSII ; photosystème I : PSI ; reactive oxygen species : ROS ; Ferredoxine : FD ; glutathione : GSH. (D'après Esmiger et al, 2006)

La première étape de la phase photochimique consiste à capter l'énergie lumineuse par des pigments spécifiques (chlorophylles b et caroténoïdes) et à la transmettre aux chlorophylles a par résonance. La chlorophylle a passe alors d'un état fondamental stable à un état excité instable. Lors de son retour à l'état fondamental, elle fournit de l'énergie sous trois formes : chimique, thermique et lumineuse (fluorescence et phosphorescence). Pour revenir à une charge neutre elle utilise les électrons présents dans l'eau qui sont libérés par électrolyse au niveau du PSII. Cette réaction, appelée réaction de Hill, libère de l'oxygène, des ions H⁺ et des électrons (figure 8). Les électrons sont pris en charge par la plastoquinone qui va les transférer jusqu'au PSI où ils serviront pour réduire une molécule de NADP⁺ en NADPH + H⁺. Les protons sont transférés à travers la membrane via une pompe à proton pour générer de l'ATP. Le NADPH et l'ATP sont les produits finaux de la phase photochimique, ils sont libérés dans le stroma et utilisés lors du cycle de Calvin (figure 8). Si des électrons issus du PSI ne sont pas utilisés pour la réduction du NADP⁺ (ce qui arrive avec la baisse d'activité des réactions biochimiques du cycle de Calvin) ils se retrouvent en contact avec l'oxygène issu de

la réaction de Hill. Les électrons en excès réagissent avec l'oxygène en produisant des formes réactives d'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) (figure 8). L'oxygène est réduit en ion superoxyde (O_2^-) qui en interaction avec l'eau va produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La production de ROS est donc favorisée quand l'énergie absorbée par la plante est en excès par rapport à celle consommée, soit parce que l'éclairement est trop important, soit parce que la capacité de prise en charge de l'énergie est réduite (comme dans le cas de basses températures).

L'accumulation de ROS est toxique pour la plante même s'il existe une voie de détoxification. Si la quantité de ROS formée est supérieure à la quantité détruite grâce au système antioxydants, les ROS occasionnent des dégâts au sein de la cellule en dégradant les pigments, les membranes des thylakoides, les protéines et les enzymes clés du métabolisme carboné : c'est le phénomène de photoinhibition (Allen et Ort, 2001).

Déstabilisation des membranes cellulaires, perte de turgescence et déshydratation

Les températures basses induisent une déstabilisation des membranes plasmiques (Murata et Los, 1997). La fluidité des membranes cellulaires dépend de leur composition lipidique et du degré de saturation des acides gras. Le froid en rigidifiant les acides gras a donc une action directe sur l'ensemble des membranes cellulaires (plus les acides gras sont saturés, plus ils seront rigidifiés par le froid). Le froid, comme la salinité ou la sécheresse, provoque également une diminution du contenu relatif en eau des cellules (Kacperska, 2004). La déshydratation des cellules se traduit par une perte de turgescence. Il existe des relations étroites entre ces trois événements primaires. La déstabilisation des membranes plasmique a deux conséquences : la première sur la perte d'électrolyte et la fuite d'ions (dont les ions Ca^{2+}) à travers la membrane plasmique qui contribue à la perte de turgescence (Campos *et al.*, 2003; Come, 1992), la deuxième sur le fonctionnement des protéines membranaires dont les plastoquinones favorisant ainsi le processus de photo-oxydation (Gombos *et al.*, 1994) (figure 8).

Ces événements primaires de réponse au froid provoquent donc des dommages, plus ou moins sévères en fonction de l'intensité du stress, sur le fonctionnement physiologique de la plante. Ils contribuent par ailleurs à l'induction des voies de signalisation et à l'activation des gènes impliqués dans les mécanismes d'acclimatation aux basses températures.

2.2.1.3 Principaux mécanismes d'acclimations aux basses températures

Les mécanismes de photoprotection

Il existe plusieurs types de réponse de la plante pour lutter contre la photoinhibition lié au stress photooxydant en condition de basses températures qui sont schématisés figure 9.

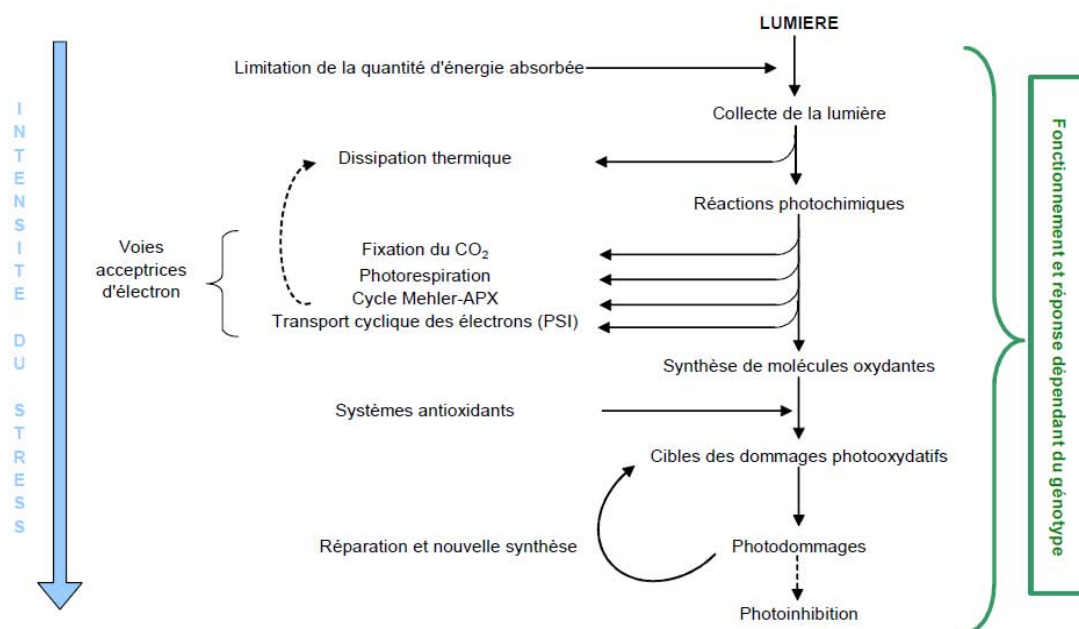


Figure 9 : Processus de photoprotection dans le chloroplaste (Niyogi, 1999) adapté par (Touchard, 2006)

La première consiste à limiter la quantité d'énergie absorbée. L'ajustement de la quantité d'énergie lumineuse absorbée peut se faire par la modification de la composition en pigments, qui constitue un mécanisme d'acclimation au froid majeur (Fryer *et al.*, 1995). D'abord par la production d'anthocyanes qui constitueraient un filtre contre la lumière et par l'ajustement de la taille des antennes collectrices. Ensuite par la modification du ratio entre chlorophylle a et b mais surtout de la proportion en caroténoïdes (β -carotène, lutéine et xanthophylles) qui jouent un rôle important dans la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Verheul *et al.*, 1995). C'est notamment la zéaxanthine en permettant de désexciter les chlorophylles a qui assurent la dissipation thermique de l'énergie dans le cycle des xanthophylle (Montané *et al.*, 1999). Une autre possibilité pour éliminer l'excès d'énergie consiste en la mise en place de voies alternatives qui puissent accepter des électrons comme le transport cyclique des électrons. L'oxygène constitue un accepteur d'électrons potentiel et permet de dissiper l'énergie soit via le cycle de calvin pour la photorespiration (Fryer *et al.*, 1998) soit par sa réduction au niveau du PSI (Niyogi, 1999). Enfin, une autre manière

d'éliminer les ROS responsables des photodommages à basse température est la synthèse de molécules antioxydantes qui vont détruire ces ROS, notamment le glutathion (figure 8).

Régulation de la synthèse des sucres et accumulation d'osmolytes

L'acclimatation au froid induit une augmentation de la concentration en sucre intracellulaire (Guinchard *et al.*, 1997). Ces sucres permettent de réguler la pression osmotique et de protéger du gel en diminuant le point de congélation de la cellule (Koster et Lynch, 1992). Les sucres (saccharose, glucose, fructose) ne sont pas les seules molécules à entrer en jeu dans la régulation et l'ajustement osmotique des cellules qui permet de lutter contre la déshydratation (Yelenosky et Guy, 1989). La proline, la glycinebetaine ou les polyols sont également des osméo-régulateurs dont la synthèse est augmentée en période d'acclimatation au froid (Xin et Browse, 2000).

Désaturation des lipides membranaires

Nous avons vu au point 2.2.1.2.2 comment le froid agissait sur les membranes plasmiques en rigidifiant des lipides et acides gras membranaires. La désaturation des lipides membranaires est un des processus majeur dans l'acclimatation au froid. Les acides gras insaturés restent plus fluides que les acides gras saturés à basse température. Les protéines membranaires peuvent ainsi conserver leurs propriétés telles que maintenir les flux d'ions à travers la membrane, ou assurer un meilleur fonctionnement photosynthétique au niveau des thylakoides (Gombos *et al.*, 1994; Wada *et al.*, 1994).

2.2.1.4 Outils de diagnostic de l'effet des basses températures

Afin d'évaluer l'impact des basses températures sur le fonctionnement physiologique des plantes en conditions de culture (serre, champ), et ainsi de déterminer leur capacité de tolérance ou d'acclimatation, il faut disposer d'indicateurs permettant de révéler les nombreuses modifications physiologiques induites par les basses températures (événements primaires ou mécanismes d'acclimatation). Les indicateurs morphophysiologiques couramment utilisés pour le screening de géotypes en réponse aux basses températures sont résumés par la figure 10.

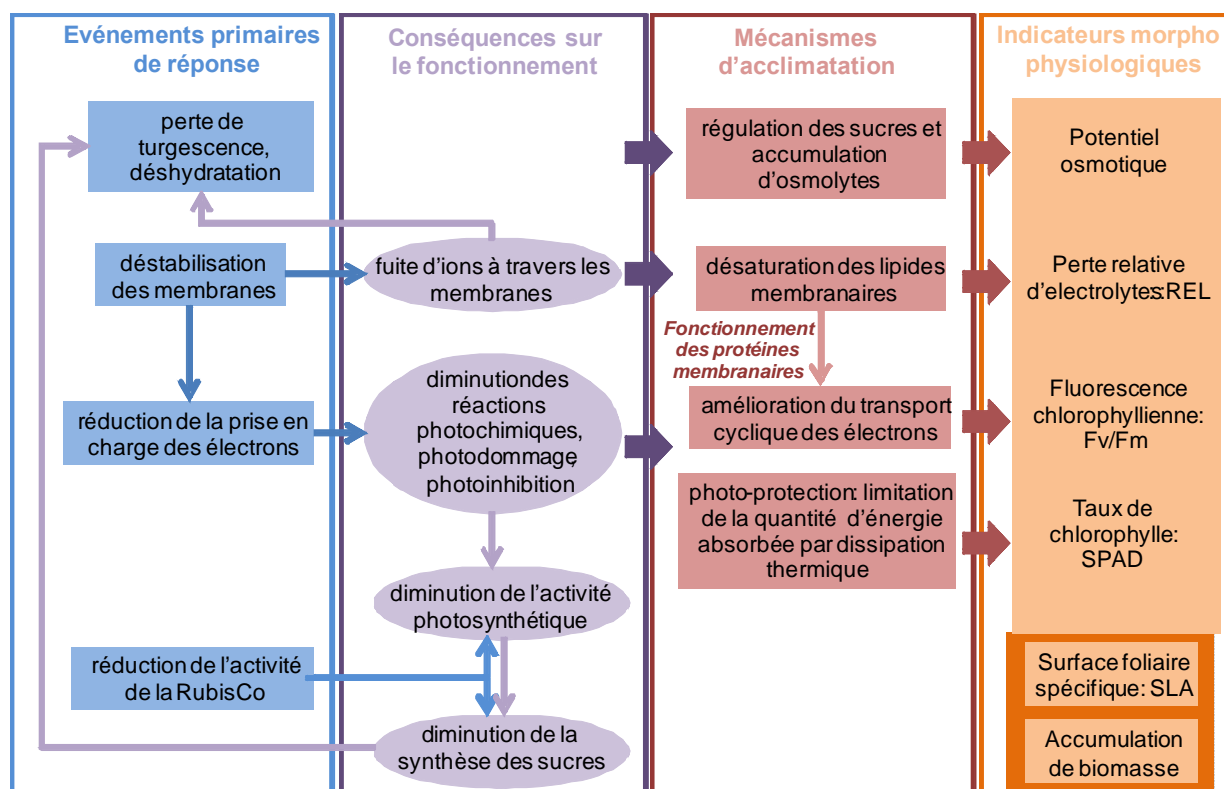


Figure 10 : Principaux processus physiologiques impliqués dans la réponse aux basses températures et outils de diagnostics associés (caractères morpho-physiologiques mesurés pour évaluer ces réponses).

Méthodes d'évaluation de l'activité photosynthétique

La photosynthèse étant un processus complexe permettant de convertir l'énergie lumineuse en énergie utilisable par la plante pour la production de biomasse, l'effet du froid sur l'activité photosynthétique peut être évalué à plusieurs niveaux en fonction de l'échelle d'analyse souhaitée.

Il est possible de regarder avec finesse l'effet des basses températures sur le fonctionnement de la photochimie en mesurant la fluorescence chlorophyllienne émise par la plante qui témoigne des pertes d'énergie lors du transfert de l'excitation vers les centres réactionnels (Gouallec *et al.*, 1991). A partir de différentes mesures d'émission de la fluorescence chlorophyllienne déterminées dans des conditions d'éclairement particulières (figure 11), plusieurs paramètres relatifs au fonctionnement des photosystèmes peuvent être déterminés.

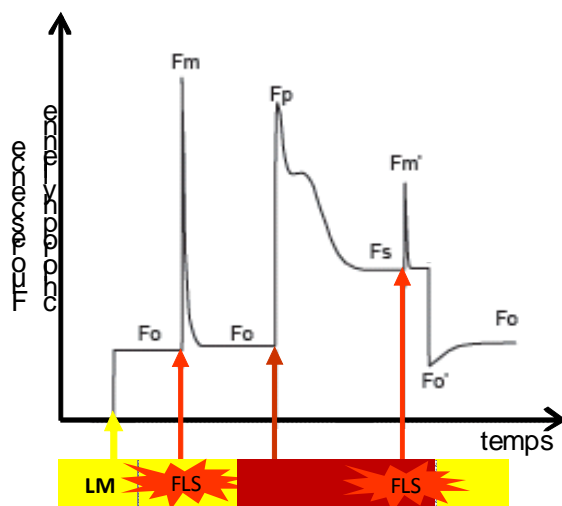


Figure 11 : Variation de la fluorescence chlorophyllienne modulée en fonction du temps sur une feuille intacte. La feuille est d'abord maintenue à l'obscurité puis éclairée par une lumière modulée, LM, de très faible intensité (la lumière analytique). La fluorescence observée monte au niveau Fo. Un flash de lumière sursaturante (FLS) est émis fermant tous les centres du PSII. L'émission de fluorescence atteint le niveau Fm puis redescend au niveau Fo. La lumière actinique, LA, fermant des centres, entraîne aussi une augmentation de l'émission de la fluorescence jusqu'à Fp, puis vers un niveau Fs. Lorsque qu'un nouveau flash saturant est émis, on atteint le niveau de fluorescence Fm'. Lorsque la LA est éteinte, on récupère le niveau Fo initial après une transitoire minimum de Fo' qui représente la valeur de Fo à la lumière et qui persiste quelques secondes à l'obscurité. (d'après (Gouallec *et al.*, 1991))

Le potentiel photochimique du PSII ($F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$) correspond au nombre maximal de centres ouverts du PSII. Le rendement quantique opérationnel du PSII à la lumière ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t)/F_m'$) correspond au taux de transfert des électrons au niveau des PSII. Cette valeur traduit la capacité de prise en charge des électrons via la chaîne de transfert des électrons au niveau du photosystème II. Si la chaîne d'électrons est saturée la valeur de Φ_{PSII} augmente. Le quenching photochimique ($qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_o)$) est une estimation de la capacité du PSII à atténuer la fluorescence liée à la concentration de centres ouverts susceptibles d'accepter l'excitation. Le quenching non photochimique ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$) correspond à la dissipation thermique de l'énergie lumineuse. Ces quatre paramètres sont largement utilisés comme indicateur de tolérance au froid (Fracheboud *et al.*, 2004; Groom et Baker, 1992; Krause, 1988; Lee *et al.*, 2002; Verheul *et al.*, 1995). Le F_v/F_m permet de mettre en évidence les dommages causés par la photoinhibition (Gouallec *et al.*, 1991; Jompuk *et al.*, 2005) et la mesure du Φ_{PSII} permet d'évaluer la réduction de l'activité photosynthétique liée aux basses températures (Fracheboud *et al.*, 2004; Fryer *et al.*, 1998).

La modification de la composition en pigments observée pour des basses températures est caractérisée par une diminution de la quantité de chlorophylle au profit des caroténoïdes. Elle peut être directement évaluée par dosage (Fracheboud *et al.*, 2004; Leipner *et al.*, 1999; Verheul *et al.*, 1995), mais peut également être estimée par une mesure simple, rapide et non destructive : le SPAD (Fracheboud *et al.*, 2004; Jompuk *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002). Le principe d'analyse est la mesure de la transmittance (en optique, la transmittance T d'un matériau correspond à la fraction de l'intensité lumineuse le traversant : $T = I/I_o$ où I_o est

l'intensité incidente et I est l'intensité sortante) lumineuse à 2 longueurs d'ondes : le rouge (650 nm) et le proche infrarouge (950 nm). La lumière transmise est mesurée et enregistrée. Le SPAD affiche ensuite un signal électrique, appelé unités SPAD ($SPAD = k * \log_{10} ((IR / I_{Ro}) / (R / R_o))$) où SPAD est la valeur délivrée par le chlorophylle-mètre (sans unité), k est une constante, I_{Ro} est l'intensité lumineuse incidente infrarouge (950 nm), IR est l'intensité lumineuse sortante avec l'infrarouge, R_o est l'intensité lumineuse incidente rouge (650 nm), R est l'intensité lumineuse sortante avec la lumière rouge). La lumière interceptée est prise en charge par les chlorophylles, donc plus la concentration en chlorophylle est forte, moins de lumière traverse la feuille et plus le rapport entre lumière incidente et sortante est faible ce qui induit une valeur de SPAD élevée.

Évaluation du potentiel osmotique

L'accumulation de solutés intracellulaires liée au processus d'acclimatation au froid peut être mesurée de façon directe en réalisant un dosage des sucres solubles, ou d'autres osmolytes comme les ions inorganiques, ou comme certains métabolites, la glycinebétaine et la proline (Hekneby *et al.*, 2006; Koster et Lynch, 1992). Mais cette mesure est lourde à mettre en œuvre et peu adaptée à une analyse génétique de l'acclimatation au froid. La mesure du potentiel osmotique est un bon indicateur de ces modifications de concentration intracellulaire à basse température (Guinchard *et al.*, 1997). La mesure du potentiel osmotique permet d'évaluer la concentration en soluté intracellulaire, mais permet également quand elle est réalisée après réhydratation de la plante, de déterminer l'ajustement osmotique réalisé par la plante en période d'acclimatation au froid (Yelenosky et Guy, 1989).

Évaluation de la stabilité des membranes

La perte de stabilité des membranes cellulaires induite par les basses températures se traduit par une diminution de sa capacité à maintenir le contenu intracellulaire à l'intérieur de la cellule. On observe donc une fuite du contenu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Etant donné que le contenu intracellulaire n'est pas neutre électriquement (composé entre autres d'électrolytes) il est possible d'évaluer cette perte d'électrolytes en mesurant la conductivité d'une solution dans laquelle une feuille a été immergée (la conductivité électrique traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique). La quantité d'électrolyte perdue après un traitement froid ramenée à la quantité totale

d'électrolytes contenue dans les cellules permet de calculer un pourcentage relatif de perte d'électrolytes. Une valeur élevée de ce pourcentage traduit une forte fuite d'ions à travers les membranes donc des membranes instables, affectées par le froid. La perte relative d'électrolytes est un test couramment utilisé pour évaluer les dommages causés par le froid sur les cellules, pour des températures basses positives (Campos *et al.*, 2003; Janowiak *et al.*, 2003), et également pour des températures négatives (Nunes et Smith, 2003).

Mesures intégratrices : accumulation de biomasse et surface foliaire spécifique

La production de biomasse est une mesure intégratrice de l'activité photosynthétique : si la photosynthèse est réduite, alors la fixation du carbone et par conséquent l'accumulation de matière sèche le sont également. C'est un indicateur facile à mettre en œuvre qui est souvent mesuré en complément de mesure de l'activité photosynthétique plus fine, comme la fluorescence chlorophyllienne et le SPAD (Fracheboud *et al.*, 2004; Jompuk *et al.*, 2005) ou la mesure de la photosynthèse nette (Fryer *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002). L'accumulation de biomasse reflète d'une manière plus générale la capacité d'une plante à se développer à basses températures donc à tolérer le froid. Sa mesure peut donc être également associée aux autres indicateurs de tolérance au froid comme l'état de stabilité des membranes ou le potentiel osmotique.

Un autre trait morphologique utilisé pour révéler l'effet des basses températures sur la capacité photosynthétique est la surface foliaire spécifique (SLA). Ce trait se mesure par le rapport entre la surface d'une feuille et sa masse sèche et il est exprimé en m²/kg. Une faible valeur de SLA signifie qu'une petite surface foliaire correspond à une forte biomasse, ce qui peut être assimilé à une forte « densité ». L'augmentation de la biomasse pour une surface foliaire définie, peut s'expliquer à basse température par une augmentation de la quantité de structures photosynthétiquement actives comme cela a été montré chez le maïs où les valeurs mesurées de SLA sont corrélées avec le ΦPSII et le SPAD (Hund *et al.*, 2005). Mais le SLA ne reflète pas que le fonctionnement photosynthétique, il est également un bon indicateur de l'effet de l'acclimatation au froid sur la quantité de sucres intracellulaires (Hekneby *et al.*, 2006), et sur des structures cellulaires comme l'épaisseur des parois cellulaires (Hund *et al.*, 2005).

2.2.2 Effet du semis précoce et des basses températures associées sur la croissance et le développement

2.2.2.1 Basses températures et développement

Germination et élongation de l'hypocotyle à basses températures

La levée au champ dépend de l'interaction entre la graine et son milieu incluant de nombreux facteurs environnementaux dont la température, l'humidité, la structure et la composition du sol (Hatfield et Egli, 1974). La phase hétérotrophique se décompose en deux phases physiologiques distinctes : les processus de germination et d'élongation de l'hypocotyle.

La germination a lieu en trois temps : l'imbibition qui correspond à l'hydratation de la semence mise en présence d'eau, la germination stricto sensu et la phase de croissance durant laquelle débute l'allongement de la radicule. La germination stricto sensu et la croissance sont des processus qui ne mettent pas en jeu les mêmes mécanismes régulateurs, la germination stricto sensu est beaucoup plus sensible aux facteurs du milieu comme la température (Côme et Corbineau, 1998). La température intervient directement en agissant sur la vitesse des réactions biochimiques dans la graine, une augmentation de température accélère la germination. A basse température, le processus de germination est plus lent qu'à température optimale en raison des nombreux processus métaboliques impliquant des réactions enzymatiques réduites avec le froid. La courbe de réponse de vitesse de germination en fonction de la température permet de déterminer trois températures caractéristiques de chaque espèce et/ou variété : la température minimale de germination, ou température de base en dessous de laquelle la vitesse de germination est nulle, la température optimale à laquelle la vitesse de germination est la plus rapide et la température maximale à partir de laquelle la vitesse de germination est nulle. Ces trois températures sont appelées températures cardinales pour la germination. La disponibilité en eau va également influencer la vitesse de germination. Un déficit hydrique va augmenter le temps nécessaire à la germination, et il existe pour chaque espèce une valeur seuil ou « potentiel hydrique de base » en dessous de laquelle la germination n'a plus lieu (Durr *et al.*, 2001). L'action combinée du potentiel hydrique et de la température a conduit au concept de temps hydro-thermique (Alvarado et Bradford, 2002). Mais sans contrainte hydrique, le modèle temps thermique est suffisant pour estimer la température de base de germination (Benech-Arnold et Sanchez, 1995).

Comme pour la phase de croissance de la racine, la température influence la vitesse d'élongation de l'hypocotyle, et il existe une température minimale spécifique de la croissance de l'hypocotyle. Cette température est très variable entre espèces, elle a été par exemple estimée à 9°C chez le maïs (Blacklow, 1972) et à 1.4°C chez l'oignon (Wheeler et Ellis, 1991). Ce caractère présente également une variabilité intra-spécifique comme cela a été montré chez la luzerne tronquée pour qui la température de base d'élongation varie de 5.5°C à 7.5°C (Brunel *et al.*, 2009).

Pour pouvoir représenter le processus de levée au champ, et prédire le temps de levée, il est nécessaire d'établir les températures de base pour la germination et pour l'élongation de l'hypocotyle qui sont deux processus indépendant sur lesquels la température n'a pas le même impact (Bewley et Black, 1994). Angus et al furent parmi les premiers à proposer un modèle (basé sur une régression linéaire) pour déterminer la réponse de la phase de levée à la température chez plus de 40 espèces (Angus *et al.*, 1980). Il a établi la température de base de levée pour toutes ces espèces, ce qui a révélé une très grande variabilité interspécifique pour ce caractère qui varie de 1.4°C chez le pois et la lentille à 14.7°C chez le guar. La température de base de levée estimée pour le tournesol est de 7.9°C, ce qui inclue à la fois la température de base de germination et d'élongation de l'hypocotyle. Chez la luzerne, une forte variabilité phénotypique pour la levée s'est exprimé en réponse à des environnements contrastés, notamment les basses températures (Brunel *et al.*, 2009). Pour caractériser l'effet des bases températures sur la levée chez le tournesol, ce qui n'a jamais été publié à notre connaissance, il faudrait donc estimer les températures de bases spécifiques à la germination et à l'élongation de l'hypocotyle pour une population présentant une diversité génétique importante.

Température et phénologie

La vitesse de développement des plantes, ou phénologie, est principalement déterminée par la température même si la photopériode l'influence également fortement (Ritchie et Smith, 1991). Chez le tournesol, les stades de développements phénologiques décrits par Schneiter et Miller (1981) répondent au modèle de temps thermique présenté précédemment (point 2.1.3.4.2. Comme nous l'avons vu, la définition d'une température de base de croissance à la base du modèle de temps thermique chez le tournesol n'est pas clairement établie. La plupart des travaux étudiant les facteurs influençant la phénologie du tournesol se sont intéressés à la

photopériode (Aiken, 2005; Goyne et Schneiter, 1987; Goyne et Schneiter, 1989; Goyne et Schneiter, 1990; Leon *et al.*, 2001). L'effet de la température sur la phénologie en interaction avec la photopériode a été étudié chez le tournesol dans les années 1980 par Goyne et Schneiter (Goyne et Schneiter, 1988; Goyne et Schneiter, 1989). Les auteurs ont montré que dans une gamme de variations de la photopériode de 14.5 à 16.2h, seule la température a un effet sur la phénologie. Au-delà de cette gamme de variation, l'effet de la photopériode doit être pris en compte pour prédire la phénologie. L'effet de la photopériode sur la phénologie interagit avec le stade de développement. De la levée au stade bouton floral (R1) le tournesol a une réponse « jour-long » : si la photopériode augmente cela va accélérer le développement. Alors que la phase de maturation des grains a une réponse « jour-court » : c'est une faible photopériode qui entraîne une diminution du temps thermique nécessaire pour la maturation des grains (de R1 à R9)(Aiken, 2005).

2.2.2.2 Effet du semis précoce et des basses températures sur la productivité

Croissance végétative à basses températures

La production de biomasse pendant la phase végétative est affectée par les basses températures principalement à cause de la réduction de la photosynthèse. L'effet de longues périodes d'exposition aux basses températures sur la croissance a été étudié chez des plantes cultivées comme le maïs, le pois, le blé et le colza (Hurry *et al.*, 1995; Lejeune-Hénaut *et al.*, 2005; Tollenaar, 1989) mais également chez des plantes modèles comme *Arabidopsis* (Wanner et Junttila, 1999). Il a été montré chez le pois que pour une même somme de temps thermique, le couvert accumule plus de biomasse à des températures d'acclimatation au froid (environ 5°C) que lorsqu'il se développe dans des conditions a priori plus favorables (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2005). De plus la répartition de la biomasse entre partie aérienne et souterraine est modifiée en condition de basses températures le plus souvent au profit de la partie souterraine (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2005; Tollenaar, 1989). Les basses températures modifient également la répartition de la biomasse au sein de la partie aérienne, entre les feuilles et la tige, induisant une diminution de la surface foliaire par plante. La répartition même de la biomasse au niveau de la feuille est modifiée avec une diminution du SLA (Tollenaar, 1989; Verheul *et al.*, 1996). La réduction de la surface foliaire par plante a un impact direct sur la quantité de lumière interceptée par le couvert. La diminution du SLA

permet en partie de compenser la diminution du potentiel photosynthétique lié à la réduction foliaire en augmentant la quantité de chloroplaste par unité de surface (Hund *et al.*, 2005).

Rendement et composition des graines dans le cas de semis précoce

En condition de semis précoces chez le tournesol, de nombreuses études ont montré que le rendement augmentait par rapport à un semis conventionnel (Flagella *et al.*, 2002; Jones, 1984; Unger, 1980). Le même résultat a été observé dans le cas de semis d'hiver dans le sud de l'Espagne (Gimeno *et al.*, 1989). Le nombre de graines par capitule augmente sans diminution de leur poids (Barros *et al.*, 2004; Gimeno *et al.*, 1989). Cette augmentation du rendement serait due principalement à une augmentation de la durée de la phase de croissance végétative et à une meilleure disponibilité en eau pendant les premiers stades de développement de la culture. Certains auteurs ont également rapportés que le semis précoce induisait une modification dans la composition en huile des graines avec une diminution de la concentration en acide oléique (mono-insaturé) au profit d'augmentation de la concentration en acide linoléique (poly-insaturé) (Flagella *et al.*, 2002; Jones, 1984; Unger, 1980). L'influence de la température durant la phase de maturation des graines sur l'activité de l'oléate désaturase (enzyme responsable de la désaturation des lipides) a été mise en cause (Flagella *et al.*, 2002; Garcés *et al.*, 1992).

Un grand nombre de processus physiologiques sont mis en jeu lors d'une exposition prolongée à des basses températures. Le stress froid induit des modifications à court terme et à long terme qui n'impliquent pas les mêmes voies de signalisation mais qui sont fortement dépendantes les unes des autres. Il apparaît donc important d'explorer le déterminisme génétique de ces processus physiologiques mis en jeu dans la tolérance et l'acclimatation aux basses températures. Il est également important de mieux connaître la variabilité génétique de ces processus physiologiques, afin de pouvoir caractériser les interactions GxE, et également d'établir des paramètres importants pour la sélection de caractères d'intérêt comme l'héritabilité ou le gain génétique.

2.3 Analyse génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques impliqués dans la tolérance et l'acclimatation aux basses températures

Le processus de sélection pour un caractère d'intérêt passe avant tout par l'évaluation de la variabilité génétique de ce caractère et de son interaction avec l'environnement. Dans des conditions de basses températures, seuls les caractères morphophysiologiques présentant une plasticité phénotypique significative pourront être utilisés comme indicateurs de sélection pour la tolérance au froid. La sélection classique a permis dès les années 70 d'améliorer significativement la tolérance au froid chez le maïs (Mock et Bakri, 1976; Mock et McNeill, 1979) et le sorgho (Bacon *et al.*, 1986).

La décomposition de la variance phénotypique est la base des méthodes dites « classiques » de sélection mais également de la sélection assistée par marqueur. Il est donc nécessaire d'évaluer pour chaque caractère morphophysiologique d'intérêt sa variabilité génétique et le maintien de celle-ci à travers différents environnements.

2.3.1 Analyse de la variabilité génétique

La valeur phénotypique d'un caractère observé pour un génotype donné dépend des conditions environnementales. Pour la plupart des caractères, le phénotype résulte des effets conjoints de 3 composantes : le génotype G, l'environnement E qui contribue toujours pour une part au phénotype et l'interaction entre le génotype et l'environnement $I_{G \times E}$. La valeur pour un phénotype peut se résumer à la formulation additive: $P = G + E + I_{G \times E}$. Cette interaction entre le génotype et l'environnement est très importante car elle signifie que l'expression d'un gène n'est pas indépendante du milieu dans lequel ce gène s'exprime. Si le phénotype est la somme d'un effet des gènes de l'environnement et de leurs interactions, alors la variance du phénotype ($\sigma^2(p)$) est la somme de la variance génétique ($\sigma^2(g)$), de la variance environnementale ($\sigma^2(e)$) et du double de la covariance entre les effets génotypiques et environnementaux ($2\text{cov}(ge)$) selon l'équation : $\sigma^2(p) = \sigma^2(g) + \sigma^2(e) + 2\text{cov}(ge)$

La réponse à la sélection, le gain génétique peut être défini pour un caractère donné comme l'écart entre les parents et la moyenne des descendants. De façon plus précise, le gain génétique représente l'écart entre la moyenne des parents et la moyenne des 10% meilleurs descendants. C'est un paramètre essentiel si l'on veut appliquer un schéma de sélection différentielle (figure 12).

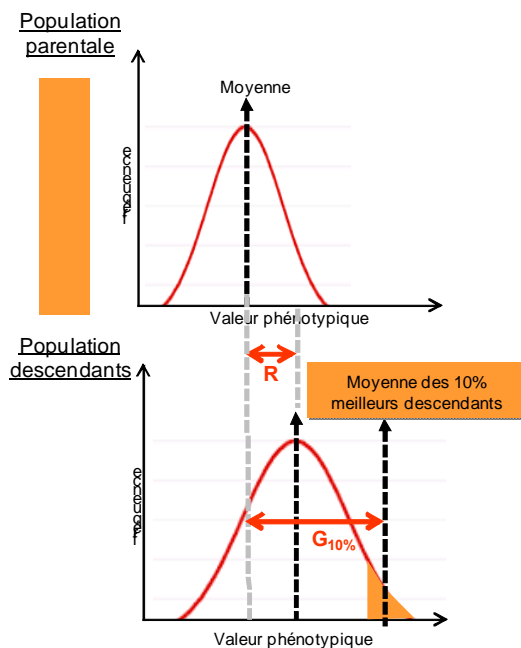


Figure 12 : sélection différentielle entre une population parentale et sa population de descendants. La réponse à la sélection est la différence entre la moyenne des parents et la moyenne des descendants (R) et le gain génétique l'écart entre la moyenne des parents et les 10% meilleurs descendants ($G_{10\%}$)

2.3.2 Recherche et identification de QTLs

2.3.2.1 Définition et intérêts

La génétique quantitative est une approche qui permet l'étude de caractères quantitatifs (ou continus) considérés comme des caractères complexes déterminés par les allèles de multiples gènes ; on parle de caractères polygéniques. La plupart des caractères polygéniques présentent une forte interaction avec l'environnement. Ils constituent la majorité des caractères à intérêt agronomiques (Dekkers et Hospital, 2002).

L'utilisation de la génétique quantitative en sélection est basée sur la connaissance de paramètres génétiques définis précédemment comme l'héritabilité, la variabilité génétique ou les corrélations génétiques. Ces paramètres peuvent être estimés dans une population par l'analyse statistique de données phénotypiques et sont utilisés en sélection classique. Depuis les années 1990, les techniques de marquage moléculaire ont permis une nouvelle approche de la génétique quantitative et donc de la sélection variétale. Le génotypage du génome à l'aide de marqueurs moléculaires a permis d'établir des cartes génétiques. La construction de carte génétique permet de localiser dans le génome les régions qui contribuent à la variation des caractères complexes ; ces régions sont appelées des QTLs (quantitative trait loci). Le principe est de réaliser une corrélation statistique entre la variation phénotypique observée pour un caractère et la variation allélique observée au niveau génétique grâce aux marqueurs moléculaires (Zeng, 1994).

La cartographie de QTLs est souvent utilisée comme étape préliminaire dans l'étude de la réponse des plantes cultivées aux stress abiotiques. L'étude génétique des mécanismes de tolérance aux températures extrêmes, à la sécheresse, aux métaux lourds ou à la salinité met en évidence deux type de QTLs : les QTLs constitutifs, stables dans toutes les conditions, et les QTLs adaptatifs, détectés uniquement en condition de stress (Collins *et al.*, 2008). Les QTLs stables sont à la base du fonctionnement du caractère étudié. Les QTLs adaptatifs représentent des QTLs d'intérêt pour l'amélioration et la sélection de variétés tolérantes à un stress abiotique.

La détection de QTLs pour un caractère d'intérêt donné conduit à deux nouvelles approches dans les méthodes de sélections, plus précises et plus rapides que les opérations classiques: la sélection assistée par marqueurs et l'identification de gènes candidats. La première méthode consiste à établir une association entre un marqueur localisé et un QTL identifié pour le caractère d'intérêt étudié. Au lieu de phénotyper une population pour sélectionner un caractère d'intérêt comme en sélection classique, la population est génotypée et les individus possédant l'allèle d'intérêt pour le marqueur associé au QTL d'intérêt seront retenus (Ribaut et Hoisington, 1998). La deuxième méthode consiste à localiser les QTLs à effet fort pour le caractère étudié et grâce à des techniques de biologie moléculaire poussées (clonage positionnel) à identifier le gène à l'origine du QTL (Rothschild et Soller, 1997). Avant de pouvoir mettre en œuvre une de ces technique, il faut s'assurer de la stabilité du QTL après l'avoir évaluée dans un grand nombre d'environnements (Zhou *et al.*, 2003).

2.3.2.2 QTLs impliqués dans la réponse aux basses températures

L'analyse génétique des traits physiologiques impliqués dans la réponse au froid a été réalisée majoritairement chez des espèces cultivées d'origines tropicales que l'on veut adapter à des environnements plus froids.

La tolérance au froid chez le maïs a été largement étudiée par une approche QTL, aussi bien en conditions contrôlées qu'en plein champ, à travers l'analyse de différents traits morpho-physiologiques représentant des échelles de fonctionnement plus ou moins fines. Les premières phases de développement (germination, croissance aérienne et souterraine) ont été étudiées à basses températures (Hund *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002) mais c'est surtout le fonctionnement photosynthétique qui a été étudié. Chez le maïs, la cartographie de QTLs en condition de culture optimales et froides a permis de révéler que le fonctionnement

photosynthétique n'était pas sous le même contrôle génétique à température optimale et à basses températures (Fracheboud *et al.*, 2004; Hund *et al.*, 2005; Jompuk *et al.*, 2005; Leipner *et al.*, 2008). Un QTL majeur impliqué dans la tolérance au froid au niveau de l'appareil photosynthétique a été localisé sur le chromosome 6, probablement en relation avec la tolérance à la photoinhibition. Hund *et al.* ont montré que la capacité photosynthétique à basses températures et la quantité de biomasse produite par unité de surface foliaire (SLA) étaient contrôlées par les mêmes régions chromosomiques, ce que l'on appelle un effet pléiotropique. Ce résultat a confirmé le rôle du SLA dans les mécanismes d'acclimatation au froid (Hund *et al.*, 2005).

Les régions génomiques impliquées dans la germination et la levée à basse température ont également été étudiées chez le sorgho (Knoll *et al.*, 2008) et validées à travers plusieurs populations et dans un grand nombre de conditions environnementales avec comme objectif finalisé un programme de sélection assisté par marqueurs (Knoll et Ejeta, 2008). Chez le riz, l'existence d'un QTL majeur associé à la tolérance au froid a été identifié pour la germination (Fujino, 2004; Lou *et al.*, 2007; Zhi-Hong *et al.*, 2005). La localisation d'un QTL majeur impliqué dans la sensibilité au froid pendant le développement végétatif a permis l'identification d'un gène candidat pour la tolérance au froid (Andaya et Tai, 2006).

Chez le tournesol, à notre connaissance, aucune étude concernant le déterminisme génétique des caractères morpho-physiologiques de tolérance au froid n'a été réalisée jusqu'à ce jour.

2.3.3 Cartes génétiques et identification de QTLs à intérêt agronomique chez le tournesol

Depuis 1995, de nombreuses cartes génétiques ont été publiées sur le tournesol, leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 1. Toutes sont issues des mêmes laboratoires de recherches qui se divisent en trois principales origines : la France, les Etats-Unis et l'Argentine. Les différentes générations de cartes ne cessent d'évoluer et d'être améliorées en fonction de l'apparition de nouveaux outils disponibles en biologie moléculaire. Les premières cartes ont été construites à partir de marqueurs RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism), puis, avec l'apparition de la PCR (Polymerase Chain Reaction), des AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et aujourd'hui, ce sont les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat), INDEL (Insertion/DEletion), TRAP (Tandem RNA Affinity Purification) et SNP (Single Nucléotide Polymorphism) qui constituent les outils moléculaires

permettant de compléter les anciennes cartes génétiques et d'en établir de nouvelles. Le déterminisme génétique de nombreux caractères a été étudié à l'aide de ces cartes comme la résistance aux maladies (Al Chaarani *et al.*, 2002; Mestries *et al.*, 1998), le fonctionnement photosynthétique (Herve *et al.*, 2001) et de nombreux traits agronomiques (Al Chaarani *et al.*, 2004; Mokrani *et al.*, 2002). Les travaux les plus récents concernent la réponse à la photopériode (Fonts *et al.*, 2008; Leon *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2001) et la tolérance à la sécheresse (Ebrahimi *et al.*, 2009; Ebrahimi *et al.*, 2008; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007a; Poormohammad Kiani *et al.*, 2009; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007b). Nous disposons dans notre laboratoire d'une carte génétique dont la dernière version a été publiée en 2007 (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007a). Elle a été construite à partir de marqueurs AFLP et SSR cartographiés sur une population de lignée recombinante issue du croisement entre PAC2 et RHA266, deux lignées contrastées (cf matériel et méthode). La grande variabilité génétique existante au sein de cette population en fait un outil potentiel privilégié pour l'exploration du déterminisme génétique des traits physiologiques impliqués dans la tolérance au froid chez le tournesol.

Auteurs et année	Population de référence	Marqueurs utilisé	Caractères étudiés	origine
Gentzbittel <i>et al.</i> , 1995	3 F ₂ and 2 BC ₁	<i>RFLP</i>	nouvelle carte.	France
Mestries <i>et al.</i> , 1998	GHxPAC2 ; F ₂ , F ₃ et F ₄	<i>RFLP</i>	Résistance au Sclerotinia, poids de 1000 grains, teneur en huile, date de floraison.	France
Flores Berrios <i>et al.</i> , 2000	PAC2 x RHA266 ; RIL (F8)	<i>AFLP</i>	Organogénèse.	France
Herve <i>et al.</i> , 2001	PAC2 x RHA266 ; RIL	<i>AFLP</i>	Photosynthèse (concentration chlorophylle, photosynthèse net, concentration interne en CO ₂ et statut hydrique (conductance stomatique, transpiration, potentielle hydrique et quantité d'eau relative.	France
Al Chaarani <i>et al.</i> , 2002	PAC2 x RHA266 ; RIL (F8)	<i>AFLP</i>	Resistance au Mildiou et au Phoma sur tige.	France
Mokrani <i>et al.</i> , 2002	L1 x L2 ; F ₃ population	<i>AFLP, SSR</i>	Caractères agronomique (délai semis-floraison, PMG, rendement en grains par plante pourcentage en huile des graines.	France
Bert <i>et al.</i> , 2004	FU x PAZ2, 5 F ₂ et F ₃	<i>RFLP, AFLP</i>	Résistance au Sclerotinia du bouton floral et du capitule, résistance au Phoma sur tige.	France
Al Chaarani <i>et al.</i> , 2004	PAC2 x RHA266 ; RIL (F8)	<i>AFLP, SSR</i>	Caractères agronomique (délai semis-floraison, hauteur de la plante diamètre da la tige, diamètre du capitule, PMG, rendement en grains par plante pourcentage en huile des graines.	France
Al Chaarani <i>et al.</i> , 2005	PAC2 x RHA266 ; RIL (F8)	<i>AFLP, SSR</i>	Germination et développement des graines (temps de 50% de germination, pourcentage de germination, longueur, poids frais et sec de la racine et de la pousse aérienne.	France
Poormohammad Kiani <i>et al.</i> , 2007	PAC2 x RHA266 ; RIL (F9)	<i>AFLP, SSR</i>	Tolérance à la sécheresse :statut hydrique (potentiel hydrique et ajustement osmotique (potentiel osmotique en condition de stress hydrique et a pleine turgescence.	France
Ebrahimi <i>et al.</i> , 2008	PAC2 x RHA266 ; RIL (F9)	<i>AFLP, SSR</i>	Tolérance à la sécheresse : qualité de l'huile (teneur en huile totale, et en acide stéarique, palmitique, oléique, linoléique.	France
Ebrahimi <i>et al.</i> , 2008	PAC2 x RHA266 ; RIL (F9)	<i>AFLP, SSR</i>	Tolérance à la sécheresse : germination (temps de 50% de germination, pourcentage de germination.	France
Poormohammad Kiani <i>et al.</i> , 2009	PAC2 x RHA266 ; RIL (F9)	<i>AFLP, SSR</i>	Tolérance à la sécheresse : caractères agronomiques (délai semis-floraison, hauteur de la plante diamètre da la tige à la floraison, surface foliaire à la floraison et évolution de la sénescence, biomasse totale à la récolte et poids du capitule.	France

Abréviations: RIL:recombinante Inbred Line; BC: back cross; PMG: poids de 1000 grains

Tableau 1 : Chronologie des différentes cartes génétiques du tournesol utilisée pour l'étude de caractères à intérêt agronomique.

Auteurs et année	Population de référence	Marqueurs utilisé	Caractères étudiés	origine
Berry <i>et al.</i> , 1995	HA 89 and ZENB8 ; F2	<i>RFLP</i>	nouvelle carte	USA/Argentine
Jan <i>et al.</i> , 1998	RHA 271 and HA 234 ; F2	<i>RFLP</i>	nouvelle carte	USA/Argentine
Leon <i>et al.</i> , 2000	ZENB8 xHA 89 ; F2 et F3	<i>RFLP</i>	Phénologie (délais semis-floraison)	Argentine
Gedil <i>et al.</i> , 2001	HA 370 xHA 372, F2	<i>RFLP, AFLP</i>	nouvelle carte	USA
Leon <i>et al.</i> , 2001	ZENB8 xHA 89 ; F2 , F2 :3 et F2 :4	<i>RFLP</i>	Intéraction phénologie- photopériode (temps thermique pour la floraison)	Argentine
Tang <i>et al.</i> , 2002	94 RHA 280 2 RHA 801 ; RIL (F7)	<i>SSR</i>	nouvelle carte	USA
Yu <i>et al.</i> , 2003	PHA x PHB ; RIL	<i>RFLP, SSR, INDEL</i>	nouvelle carte	USA/Argentine
Pérez-Vich <i>et al.</i> , 2004	HA-89xCAS-20 ; F2	<i>RFLP, SSR</i>	Taux d'acide stéarique dans les graines	USA/Argentine
Pérez-Vich <i>et al.</i> , 2005	NMS801xNMS373; F2 et BCF1	<i>RFLP, SSR, INDEL</i>	stérilité male	USA/Argentine
Lai <i>et al.</i> , 2005	RHA 280x RHA 801; RIL F7	<i>SNP</i>	nouvelle carte	USA
Yue <i>et al.</i> , 2009	feuille jaune x feuilles verte; F2	<i>SSR, TRAP</i>	taux de chlorophylle (quantité chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>)	USA/ Chine
Micic <i>et al.</i> , 2004 et 2005	NDBLOSsel × CM625 ; RIL (F6)	<i>SSR</i>	Résistance au Sclerotinia sur tige, longueur des feuilles	Allemagne

Tableau 1 : suite

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériel végétal

3.1.1 Population de lignées recombinantes

La population de lignées recombinantes de tournesol (*Helianthus annuus L.*) étudiée est issue du croisement entre PAC2 et RHA266. C'est la huitième génération (F8) obtenues par la méthode SSD (single seed descent). RHA266 est le résultat du croisement réalisé par USDA entre un tournesol sauvage *H.annuus* et Peredovik, une variété cultivée. PAC2 provient de l'INRA, c'est le résultat d'un croisement entre le génotype HA61 et un tournesol sauvage *H.petiolaris* (Gentzbittel *et al.*, 1995). RHA266 est un génotype très résistant au mildiou avec un rendement, un poids de 1000 grains et une teneur en huile supérieure à PAC2. Notre laboratoire dispose d'un ensemble de 150 lignées recombinantes dont seulement 98 ont été utilisées dans le cadre de nos expérimentations.

3.1.2 Variétés issues du progrès génétique

Vingt variétés représentant le progrès génétique de ces vingt dernières années ont été utilisées dans le cadre des nos expérimentations. Ces génotypes, fournis par l'INRA de Clermont Ferrand, ont par ailleurs été caractérisés pour leur productivité (Debaeke *et al.*, 2003) et pour leur résistance à la sécheresse (Casadebaig, 2008; Casadebaig *et al.*, 2008). Les caractéristiques de ces variétés sont décrites tableau 2.

Tableau 2: description des vingt variétés paramétrées dans le modèle SUNFLO

variété	année inscription	selectionneur	pays	type d'architecture	description
Peredovik	1960	V.N.I.I.M.K.	Russie	Parasol	Pollinisation libre
INRA6501	1970	I.N.R.A.	France	Parasol	1er hybride avec stérilité mâle génétique
Remil	1974	I.N.R.A.	France	Parasol	1er hybride faiblement résistant au mildiou
Airelle	1973	I.N.R.A.	France	Parasol	
Relax	1975	I.N.R.A.	France	Sapin	1er hybride avec stérilité mâle cytoplasmique
Mirasol	1978	Semences Cargill	France ; U.S.A.	Sapin	1er C.M.S. faiblement résistant
Primasol	1979	I.N.R.A. ; C.S.T.	France	Sapin	CMS, très précoce
Cargisol	1983	Semences Cargill	France ; U.S.A.	Parasol	
Viki	1984	Maisadour ; G.K.I	France ; Hongrie	Sapin	
Frankasol	1984	Semences Cargill	France ; U.S.A.	Parasol	
Albena	1988	Prograin Génétique ; I.W.S.	France ; Bulgarie	Sapin	
Vidoc	1989	Maisadour ; G.K.I	France ; Hongrie	Sapin	Susceptible au Sclerotinia du bouton
Euroflor	1988	Rustica Semences ; Sigco	France ; U.S.A.	Parasol	Tardif
Santiago	1993	Hilleshög-NK ; I.C.C.P.T.	France ; Roumanie	Sapin	
DK3790	1994	R.A.G.T. ; G.K.I. ; Dekalb	France ; Hongrie ; U.S.A.	Sapin	
Prodisol	1995	Semences Cargill	France	Parasol	
Melody	1996	Hilleshög-NK	France	Parasol	
LG5660	1998	Limagrains Genetics	France	Parasol	
Allstar	1999	Rustica-Prograin Génétique ; I.W.S.	France ; Bulgarie	Sapin	
Heliasol	2000	S.D.M.E. ; K.W.S.	France ; Allemagne	Parasol	

3.2 Conditions de cultures

3.2.1 Au champ

Les conditions de cultures au champ sont résumées dans le tableau 3. Les lignées recombinantes ont été semées en 2007 dans deux localités aux conditions pédoclimatiques contrastées : Auzeville (France) et Constantine (Algérie). En France trois dates de semis ont été réalisées. La première date de semis a été abandonnée en raison de dégâts importants causés par des ravageurs et des oiseaux. En Algérie seulement deux dates ont été réalisées. Les variétés du progrès génétique ont été semées uniquement à Auzeville en 2007 et en 2008. Tous les semis ont été réalisés selon des dispositifs en blocs randomisés avec trois répétitions.

Tableau 3 : Conditions de semis au champ en 2007 et 2008 pour les deux types de matériel végétal utilisé : les lignées recombinantes et leurs deux parents, et les variétés issues du progrès génétique.

matériel	année	site	date des semis		nombre de géotypes	surface UE	nombre de plantes /UE	nombre de répétitions
			précoces	conventionnelles				
<u>LIR</u>	2007	Auzeville	22 février ¹	19 avril	100	3m ² (2 rangsx 3m)	24	3
			14 mars			3m ² (2 rangsx 3m)	24	3
	2007	Constantine	03 mars	26 mars	100	3m ² (2 rangsx 3m)	24	3
						3m ² (2 rangsx 3m)	24	3
<u>PG</u>	2007	Auzeville	22 février ²	19 avril	20	4.5m ² (3 rangsx 3m)	36	3
			14 mars		20	4.5m ² (3 rangsx 3m)	36	3
	2008	Auzeville	13 février	2 mai	7	10m ² (4 rangsx 5m)	65	3
			13 mars		7	10m ² (4 rangsx 5m)	65	3

¹ abandonné à partir du stade R1

² abandonné dès la levée

abréviations: LIR: Lignées Recombinantes; PG: variétés issues du progrès génétique; UE: Unité expérimentale

3.2.2 En condition contrôlée

Les paramètres de germination et de croissance hétérotrophique ont été établis pour les deux populations en conditions contrôlées. Sous une hotte stérile les graines de tournesol ont été désinfectées (hypochlorite de sodium dilué à 2,6%), rincées, puis déposées dans une boîte de pétri (90mm de diamètre) contenant deux papiers filtres et 3ml d'eau osmosée. Les boîtes de pétri ont été refermées avec du parafilm, afin de limiter les contaminations extérieures et l'évaporation de l'eau, puis placées à l'obscurité dans un incubateur à température constante. Les graines ont été mises à germer à 3°C, 4.6°C, 7°C, 10°C et 15°C. Le dispositif expérimental était constitué de six répétitions par génotype et par température, une répétition étant représentée par une boîte de pétri contenant quatre graines.

3.3 Mesure des traits agro-morphologiques et physiologiques

3.3.1 Caractères de croissance et de développement impliqués dans le formalisme du modèle SUNFLO

La phase « semis levée » :

En condition contrôlée, le nombre des graines germées dans chaque boîte de pétri a été suivi quotidiennement. La date moyenne de germination correspond à la date où 50% des graines ont germé (apparition du germe).

Le suivi de la croissance de l'hypocotyle a été réalisé par deux mesures : 90°Cj et 120°C après le semis. La vitesse moyenne d'allongement de l'hypocotyle entre les dates 90°Cj et 120°Cj a été calculée de la façon suivante : longueur de l'hypocotyle à 120°Cj moins longueur de l'hypocotyle à 90°Cj divisée par le nombre de jours entre les deux dates 90°Cj et 120°Cj.

La phénologie

Tous les stades de développement phénologiques ont été déterminés selon l'échelle de (Schneider et Miller, 1981), quand 50 % des plantes par parcelle avaient atteint le stade donné (figure 13). Les dates de chaque stade phénologique ont été traduites en jours juliens (jj) c'est-à-dire en nombre de jours depuis de 1^{er} janvier de l'année.

Le temps thermique (TT en °Cj) pour atteindre chaque stade a été calculé en intégrant au cours du temps le nombre de degrés jours efficaces entre deux dates (t_1 et t_2) selon l'équation 10 où T correspond à la température moyenne journalière et T_b la température de base de croissance.

$$TT = \int_{t_2}^{t_1} (T - T_b).dt \quad (\text{équation 10})$$

La température de base de croissance utilisée est de 4.8°C (Granier et Tardieu, 1998).

Stades végétatifs: *germination-levée*



V-E



Une feuille doit
atteindre 4cm

Stades végétatifs: *croissance végétative*



V-2



V-4



V-12

Stades reproducteurs: *phase bouton floral*



R-1



R-2



R-3



R-4

Stades reproducteurs: *floraison*



R-5.1



R-5.5



R-5.9



R-6

Stades reproducteurs: *maturation*



R-7



R-8



R-9

Figure 13: Représentation des stades phénologiques pour la croissance végétative, la floraison et la maturité physiologique d'après Schneiter, et Miller. (1981)

Surface foliaire à la floraison, production de biomasse et rendement

La surface foliaire par plante a été déterminée de deux manières : soit par une mesure directe de la surface foliaire réelle avec un planimètre (LI-3000 Area Meter, LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA), soit calculée à la floraison à partir de l'équation 11 (Pilorgé *et al.*, 2004; Pouzet et Bugat, 1985) où NF est le nombre total de feuilles, L et l sont respectivement la longueur et la largeur de la plus grande feuille et LN la position de la plus grande feuille.

$$SF = \frac{1}{2}(L \times l \times 0.7 \times LN) + (NF \times 30) \quad (\text{équation 11})$$

Le LAI (Leaf Area Index) a été calculé en multipliant la surface foliaire par plante (SF) par la densité (d) selon l'équation 12.

$$LAI = SF \times d \quad (\text{équation 12})$$

La biomasse aérienne a été mesurée après que les plantes aient été récoltées puis séchées à l'étuve pendant 48h à 80°C.

A la récolte, le rendement exprimé en q/ha (RDT) a été déterminé par parcelle et exprimé en grains propres et secs. L'indice de récolte (IR) a été mesuré à partir de 3 plantes par parcelle en calculant le rapport entre la quantité de graines sèches produites et la quantité de biomasse sèche aérienne totale.

3.3.2 Mesure des caractères physiologiques impliqués dans la réponse aux basses températures

Les prélèvements pour les mesures physiologiques ont été effectués 800°Cj après le semis pour toutes les dates de semis. Pour chaque parcelle expérimentale représentant un génotype, trois plantes ont été prélevées, séchées (48h à 80°C) puis pesées afin de déterminer la biomasse sèche. Une autre plante, jugée représentative du génotype, a été échantillonnée puis placée 24h en chambre froide (4°C à l'obscurité) avant de réaliser les mesures. Plusieurs mesures ont été réalisées, le protocole utilisé est résumé figure 14.

3.3.2.1 Fonctionnement photosynthétique

La fluorescence chlorophyllienne

La méthode utilisée pour mesurer la fluorescence chlorophyllienne est la méthode du flash saturant réalisé avec un fluorimètre Walz (PAM-2000). La mesure a été réalisée sur la troisième feuille la plus développée. Après adaptation à l'obscurité, un flash saturant (8000 $\mu\text{mol.m}^{-2}/\text{s}$) d'une seconde a été appliqué. L'acquisition du paramètre Fv/Fm est directement faite par le fluorimètre Walz (PAM-2000)

Le taux de chlorophylle (SPAD)

Le taux de chlorophylle a été mesuré par le chlorophyllemètre SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japan). La mesure a été réalisée quatre fois sur la 3^{ème} feuille la plus développée puis ramenée à sa valeur moyenne pour minimiser les erreurs liées aux variations de texture de la feuille (induites par exemple par les nervures).

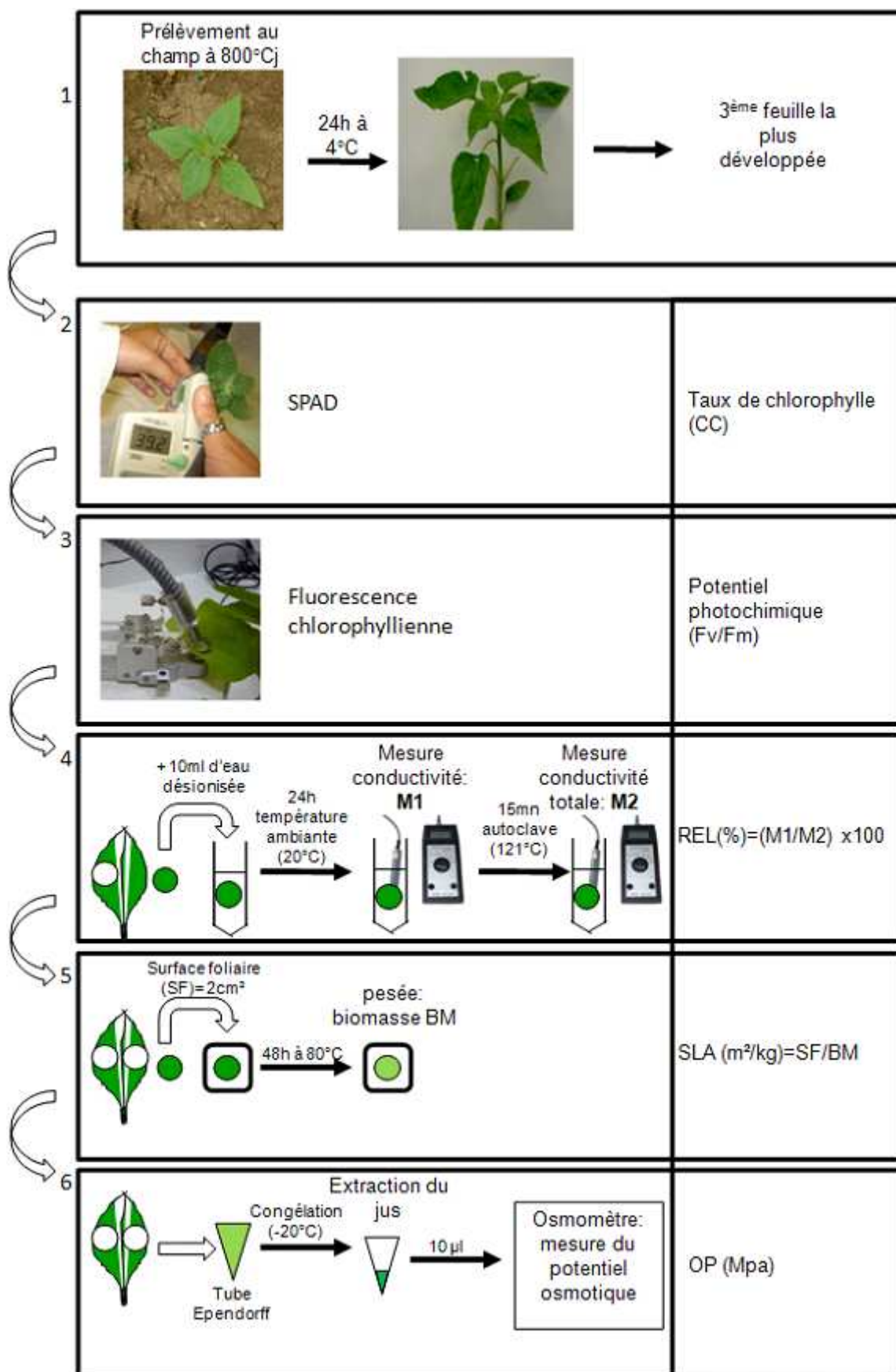


Figure 14 : Protocole expérimentale utilisé pour réaliser les mesures physiologique. Les mesures sont présentées chronologiquement.

La surface foliaire spécifique (SLA)

Un disque de 2 cm² de surface a été découpé sur la 3^{ème} feuille la plus développée de chaque plante puis pesé après un passage à l'étuve 48h à 80°C.

3.3.2.2 Stabilité des membranes plasmiques (REL)

La fuite d'électrolytes à travers la membrane plasmique a été mesurée grâce à un conductimètre (WTW LF 95, sonde TetraCon 96). Le conductimètre WTW préalablement étalonné avec de l'eau déminéralisée, permet d'afficher directement la valeur de la conductivité de la solution.

Un disque de 2cm² de surface a été découpé sur la 3^{ème} feuille la plus développée, rincé à l'eau déminéralisée puis mis à flotter dans un tube avec 10ml d'eau déminéralisée à température ambiante pendant 24h, avant de réaliser la première mesure de conductivité (M1) qui est relative à la quantité d'électrolytes ayant traversé les membranes. Les tubes ont ensuite été placés pendant 20min à l'autoclave à 121°C afin d'éclater les cellules et de libérer tous les électrolytes contenus dedans, puis une seconde mesure de la conductivité, correspondant à la conductivité totale (M2) a été réalisée après que les échantillons aient retrouvé la température ambiante. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'électrolytes ayant traversé les membranes par rapport à la quantité totale d'électrolytes (REL pour Relative Electrolyte Leakage) selon le protocole de Campos *et al.* (2003).

3.3.2.3 Potentiel osmotique

La mesure du potentiel osmotique a été réalisée à partir de la 3^{ème} feuille la plus développée à pleine turgescence. Après avoir été congelé, le jus de la feuille a été recueilli. Ensuite, 10µl de ce jus de feuille ont été introduits dans l'osmomètre (modèle Wescor 5520, Logan, Utah, USA) préalablement calibré avec des étalons standards prêts à l'emploi. L'osmomètre donne la valeur du potentiel osmotique ϕ_s en mmol/kg en utilisant la relation de Van't Hoff ($\phi_s = -RTdc$, où R est la constante des gaz parfaits, T est la température en Kelvin, d est la densité de l'eau à la température T et c'est la concentration de solutés osmotiquement actifs). Cette valeur a ensuite été convertie en MPa (1MPa = -(0.0083143x0.298x 1mmol/kg)).

3.4 Analyse génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques

3.4.1 Variabilité génétique et gain génétique

La décomposition de la variance phénotypique a été réalisée pour les différentes populations étudiées à l'aide d'un modèle linéaire composé des facteurs suivants : « dates de semis », « génotypes » et « répétition ». Une ANOVA a ensuite été réalisée sur le modèle. A partir de la variabilité génétique observée au sein de la population de LIRs, le gain génétique a également été calculé

3.4.2 Détection des QTLs chez les lignées recombinantes (LIRs)

La recherche de QTLs a été réalisée par la méthode du Composit Interval Mapping (CIM) à l'aide logiciel QTLCartographer version 2.5 (Basten *et al.*, 2007; Zeng, 1994). La méthode CIM est un modèle qui prend en compte deux paramètres : le nombre de marqueurs qui contrôlent le fond génétique et la taille de la fenêtre qui limite des deux côtés les marqueurs flanquant la région testée (Zeng, 1994). Les paramètres utilisés dans le cadre de ce travail sont de 15 marqueurs pour contrôler le fond génétique avec une fenêtre d'exploration fixée à 15 cM (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007a).

Le degré de significativité de chaque intervalle testé est exprimé par un rapport de vraisemblance ou LODscore qui correspond à la probabilité qu'il existe un QTL dans la région explorée.

4 RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Analyse et modélisation des interactions génotype x environnement x conduite dans le cas de semis précoces du tournesol et de son exposition aux basses températures en période juvénile

4.1.1 Introduction

L'utilisation de modèles de cultures (Jeuffroy *et al.*, 2008) peut aider à la recherche de stratégies techniques optimales dans le cadre d'une gestion durable des ressources environnementales et du maintien d'une agriculture rentable. Ceci prend tout son sens dès lors que les conditions environnementales sont très fluctuantes (en particulier le régime pluviométrique pour une culture d'été).

Le modèle de simulation SUNFLO a été conçu comme un outil d'évaluation variétal et d'aide au choix « variété – milieu – conduite » pour la culture de tournesol (Casadebaig, 2008). Par rapport aux modèles « tournesol » déjà existants (Cabelguenne *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1993; Pereyra-Irujo et Aguirrezábal, 2007; Villalobos *et al.*, 1996), SUNFLO prend en compte de manière explicite la représentation de la variété et sa réponse aux contraintes environnementales. Il tient compte de la variabilité génétique au travers de paramètres dits « génotypiques ». Ainsi, il est capable d'analyser et de prévoir le comportement de différents génotypes dans des environnements contrastés tant sur le plan hydrique qu'azoté, c'est-à-dire de mettre en évidence les interactions génotype-environnement, ce dernier terme désignant aussi bien l'environnement climatique que le microclimat et le sol modifié par les techniques culturales. SUNFLO a été également utilisé pour évaluer les impacts de différentes modifications de la conduite de la culture, comme par exemple la date de semis (Casadebaig, 2008). Ces résultats ont révélé que la date de semis traditionnellement pratiquée dans la région Midi-Pyrénées (aux alentours du 15 avril) ne semblait pas optimale dans le système simulé. Cela met en évidence le gain potentiel qu'il y aurait à faire évoluer les pratiques. Cela incite également à rechercher des pratiques innovantes permettant de répondre aux nouveaux défis de l'agriculture durable, notamment dans le domaine de la gestion des ressources en eau. Parmi ces pratiques, le semis anticipé de tournesol (d'un à deux mois par rapport à la date de semis traditionnelle) est considéré comme une alternative envisageable pour esquiver la sécheresse estivale. En effet, dans le cas de la culture de tournesol, culture d'été non irriguée,

les sécheresses estivales sont un des principaux facteurs limitants du rendement et de la teneur en huile.

Il paraît ainsi logique d'utiliser SUNFLO pour évaluer des génotypes dans ce nouveau contexte en vue de la sélection des idéotypes les mieux adaptés. Par la prise en compte de la variabilité climatique, SUNFLO peut être un outil d'évaluation des impacts du semis précoce sur l'esquive de la sécheresse estivale et sur l'élaboration du rendement du tournesol.

Avant de pouvoir utiliser le modèle de manière pertinente, une première étape consiste à évaluer la qualité prédictive du modèle dans des conditions de dates de semis non conventionnelles, associées à des basses températures en début de cycle. Dans un second temps, l'évaluation de semis précoces comme méthode d'esquive de la sécheresse estivale sera évaluée sur un grand nombre de séries climatiques. Plusieurs scénarii seront évalués à travers l'étude d'idéotypes variétaux différenciés pour leur précocité.

4.1.2 Evaluation de la qualité prédictive du modèle en condition de semis précoces

4.1.2.1 Introduction

Les modèles de cultures sont aujourd'hui des outils puissants pour l'évaluation de nouvelles pratiques et pour l'aide à la décision. Mais les modèles de cultures développés sur la base de conduites classiques de culture ne sont pas toujours valides dans le cas de conduites trop décalées par rapport aux situations qui ont servi à construire et paramétrer le modèle. Il apparaît alors nécessaire de réaliser une évaluation du modèle dans ces conditions nouvelles avant toute utilisation. Une partie centrale dans l'évaluation d'un modèle est de comparer les prédictions du modèle avec des valeurs observées. Cela permet de mettre en évidence d'éventuels écarts et de suggérer des améliorations possibles pour réduire ces écarts.

Dans le cas du modèle SUNFLO, nous cherchons à vérifier sa capacité de prédiction dans des conditions de semis très précoces induisant une baisse significative de la température en début de cycle. Nous cherchons ainsi à étendre le domaine de validité initial du modèle. Pour des semis en avril ou mai, le modèle prédit le rendement avec une erreur (RMSE) de 3 à 5.5 q/ha et la date de floraison avec une erreur de 2.7 jours (Casadebaig, 2008). Si la marge d'erreur est encore trop grande pour permettre de différencier deux variétés de performance proche dans des environnements peu contrastés, elle est suffisante pour discriminer des variétés appartenant à différentes générations de sélections. Le modèle SUNFLO a déjà été utilisé pour évaluer l'impact de la modulation de la date de semis (Casadebaig, 2008). Les dates utilisées lors de cette évaluation étaient échelonnées du 1^{er} mars au 25 mai, couvrant déjà une gamme extrême par rapport à la pratique courante. Les objectifs de cette nouvelle évaluation sont de comparer les valeurs observées aux valeurs simulées par le modèle pour plusieurs génotypes et pour des dates de semis anticipées de un à deux mois par rapport à la pratique habituelle. La qualité prédictive du modèle sera évaluée pour plusieurs variables de croissance et de développement au cours du cycle et à la récolte.

4.1.2.2 Matériels et méthodes

Matériel végétal et conditions expérimentales

Sept variétés paramétrées pour le modèle SUNFLO par Casadebaig (2008) ont été semées en 2007 et en 2008 (Frankasol, INRA6501, Mirasol, Prodisol, Melody, Peredovik et Vidoc). En 2007, un semis conventionnel (SC, 19 avril) et un semis précoce (SP2, 14 mars) ont été

réalisés, alors qu'en 2008, trois dates de semis ont été pratiquées: le semis conventionnel (SC, 2 Mai) et deux semis précoces (SP1 : 13 Février et SP2 : 13 mars). Trois variétés parmi ces sept (Melody, Peredovik et Vidoc), choisies parce qu'elles présentaient des réponses aux basses températures contrastées, ont fait l'objet d'un dispositif supplémentaire en 2008. Afin d'étudier l'évolution de l'efficacité biologique pendant la période de croissance végétative, ces trois variétés ont été semées deux fois pour pouvoir disposer d'une parcelle de prélèvement.

Le dispositif est du type split-plot à 3 répétitions. La taille des parcelles élémentaires est de 4.5 m² en 2007 (3 rangs espacés de 50cm sur 3 m de long) et de 10m² en 2008 (4 rangs sur 5 m de long). En 2007, 80 unités d'azote ont été apportées le jour du semis. En 2008, 90 unités d'azote ont été apportées le 14 Mai pour les deux semis précoces et le 6 Juin pour le semis conventionnel.

Les données météorologiques ont été enregistrées quotidiennement par la station météorologique d'Auzeville. La température minimale et maximale, la pluviométrie et le rayonnement global incident ont été mesurés à 2 mètres au dessus du couvert végétal.

Mesure des traits agro-morphologiques

La date de levée a été déterminée quand 50 % des plantes par parcelle atteignent le stade émergence (VE) selon l'échelle de (Schneider et Miller, 1981). Les stades E1, R2, M0, et M4 ont été déterminés pour chaque parcelle de la même manière. Pour les parcelles de prélèvements, les dates de chaque stade végétatif (V-2, V-4, V-6, V-8, V-10 et V-15) ont également été déterminées. La date de chaque stade phénologique a été traduite en jours juliens (jj) et en temps thermique. La somme de température efficace (°Cj) pour atteindre un stade donné a été calculée en additionnant le nombre de degrés jours efficaces depuis la date de levée. La température de base de croissance utilisée est de 4.8°C (Granier et Tardieu, 1998).

A la floraison, la surface foliaire et la biomasse d'une plante ont été mesurées par parcelle. La surface foliaire (SF) a été calculée à partir de l'équation 11 (Pilorgé *et al.*, 2004; Pouzet et Bugat, 1985). Après avoir été mesurées, les plantes ont été récoltées, séchées à l'étuve pendant 48h à 80°C puis pesées. La densité de peuplement (d, plantes/m²) a été calculée à la floraison. Le LAI (Leaf Area Index) a été calculé selon l'équation 12. La biomasse aérienne

par m² a été calculée à la floraison (TDMF1) pour chaque parcelle en multipliant biomasse moyenne d'une plante par la densité à chaque stade.

L'efficacité d'interception du rayonnement photosynthétique ε_i , a été calculée à partir de la valeur du LAI et du coefficient d'extinction k selon l'équation 13. Le coefficient k dépend du port de la plante et il est caractéristique de la variété.

$$\varepsilon_i = 1 - e^{-k.LAI} \quad (\text{équation 13})$$

A la récolte, le rendement exprimé en q/ha (RDT) a été déterminé par parcelle et exprimé en grain propre et sec. L'indice de récolte (IR) a été mesuré à partir de 3 plantes par parcelle en calculant le rapport entre la quantité de graines sèches produites et la quantité de biomasse sèche aérienne totale.

Mesure de l'évolution de l'efficacité biologique du semis à la floraison

A chacun des stades phénologiques déterminés de la levée à la floraison, trois plantes par parcelle ont été prélevées aléatoirement. La surface foliaire réelle (SF) a été mesurée au planimètre (LI-3000 Area Meter, LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA) puis ramenée à une surface foliaire par m² de sol (LAI). Les plantes entières ont ensuite été séchées à l'étuve (48h à 80°C) avant d'être pesées pour déterminer la biomasse (TDM).

L'évolution du LAI au cours du temps (en jj) a été établie pour chaque variété selon la fonction logistique décrite par l'équation 14 :

$$LAI = \frac{c}{1 + \exp^{-a(jj - b)}} \quad (\text{équation 14})$$

L'équation (5) permet de simuler une valeur journalière du LAI. A partir de cette valeur, l'efficacité d'interception du rayonnement a été déterminée selon l'équation 13.

Connaissant le rayonnement global journalier (R_g), la quantité de rayonnement photosynthétiquement actif interceptée par le couvert (PAR_i) a été calculée selon l'équation 15, où l'efficacité climatique (ε_c) est considérée comme égale à 0,48 en conditions naturelles.

$$PAR_{i(t)} = R_{g(t)} \times \varepsilon_c \times \varepsilon_i \quad (\text{équation 15})$$

L'efficacité biologique (ε_b) est une efficacité de conversion du PAR en biomasse. Elle a été calculée comme le rapport entre la biomasse aérienne produite (ΔMAS) et le PAR intercepté par la culture (ΔPAR_i) sur un intervalle de temps (entre t_1 et t_2) à partir de l'équation 16 (Bonhomme, 2000).

$$\varepsilon_b = \frac{\Delta MAS}{\Delta PAR_i} \quad (\text{équation 16})$$

Le modèle SUNFLO: variables d'entrées et de sorties

Les variables d'entrées du modèle relatif aux conditions expérimentales sont les reliquats azotés dans les deux premiers horizons (profondeur 1m50), la date de semis et la densité de peuplement. Selon les besoins, la date de levée peut être simulée ou forcée, dans ce second cas, la date de levée imposée est celle qui a été observée au champ.

Les variables de sorties du modèle que nous avons mesurées et simulées sont : le temps thermique du semis à la floraison (TT_SF), le temps thermique de la levée à la floraison (TT_LF), la date de levée (JL), le temps thermique de la floraison à la récolte (TT_FR), la date de floraison (DF), la biomasse aérienne à la floraison (TDM-F), le LAI à la floraison (LAI-F), l'efficacité d'interception du rayonnement de la levée à la floraison selon un pas de temps journalier (ε_i), l'efficacité biologique de la levée à la floraison selon un pas de temps journalier (ε_b), l'indice de récolte (IR) et le rendement à la récolte (RDT).

Analyses statistiques

Pour évaluer la variabilité génétique pour les différentes conditions de semis, nous avons calculé la moyenne et l'écart-type variétal pour toutes les variables observées. L'analyse des interactions G X E a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire, construit en incluant les effets « variété », « semis » et « répétition ». Pour chaque variable étudiée, l'homogénéité des variances a été vérifiée par le test statistique de Levene, et la normalité de leur distribution par le test de Shapiro-Wilk. Une ANOVA a été réalisée à partir ce modèle pour mettre en évidence les effets de chaque facteur ainsi que les effets d'interactions.

Les valeurs prédites (issues des simulations) ont été confrontées aux valeurs observées et un coefficient de corrélation a été calculé, l'ensemble étant illustré graphiquement (Wallach, 2006). Pour évaluer la qualité de prédiction du modèle le RRMSE-P (Relative Root Mean Square Error of Prediction) a été calculé pour les conditions de semis précoces (SP) et de

semis conventionnels (SC) selon l'équation 17 où y_i et \hat{y} sont respectivement les valeurs observées et prédites et N le nombre total de situations.

$$RRMSE-P = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i} \quad (\text{équation 17})$$

4.1.2.3 Résultats

Effets du semis précoce sur les caractères observés et analyse des interactions G X E

	source	SC	df.	CM	F	Sig.
<u>TT_SL</u>	G	2595	6	433	3.15	NS
	E	1241	1	1241	9.05	*
	G * E	823	6	137	0.592	NS
	residus	20625	89	232		
<u>TT_LF</u>	G	30854	6	5142	3.608	NS
	E	160	1	160	0.112	NS
	G * E	8560	6	1427	1.725	NS
	residus	73624	89	827		
<u>TT_SF</u>	G	39716	6	6619	5.507	*
	E	788	1	788	0.655	NS
	G * E	7216	6	1203	1.344	NS
	residus	79636	89	895		
<u>TT_FR</u>	G	211765	6	35294	3.271	NS
	E	698082	1	698082	64.619	***
	G * E	64818	6	10803	2.634	*
	residus	365084	89	4102		
<u>LAI-F</u>	G	18.31	6	3.05	5.74	*
	E	1.23	1	1.23	2.306	NS
	G * E	3.19	6	0.53	0.725	NS
	Error	57.86	79	0.73		
<u>ei-F</u>	G	0.12	6	0.02	19.446	***
	E	0.01	1	0.01	5.343	NS
	G * E	0.01	6	0	0.34	NS
	residus	0.26	85	0		
<u>TDM-F</u>	G	930078	6	155013	14.014	**
	E	518930	1	518930	46.988	***
	G * E	66070	6	11012	0.296	NS
	residus	3120994	84	37155		
<u>IR</u>	G	0.03	6	0	1.77	NS
	E	0	1	0	0.013	NS
	G * E	0.02	6	0	2.319	*
	residus	0.1	86	0		
<u>RDT</u>	G	825	6	138	1.995	NS
	E	56	1	56	0.817	NS
	G * E	414	6	69	0.969	NS
	residus	6329	89	71		

Tableau 4: Analyse de variance à deux facteurs sur l'ensemble des variables observées pour tester les effets génotype (G), date de semis (précoce ou conventionnel) (E) et les interactions entre les deux facteurs (G*E). Les variables observées sont : le temps thermique du semis à la levée (TT_SL), le temps thermique du semis à la floraison (TT_SF), le temps thermique de la levée à la floraison (TT_LF), le temps thermique de la floraison à la récolte (TT_FR), la biomasse aérienne à la floraison (TDM-F), le LAI à la floraison (LAI-F), l'efficacité d'interception à la floraison (ei-F), le rendement à la récolte (RDT), l'indice de récolte (IR).

Avec df., degré de liberté; SC, Somme des carrés; CM, Carré moyen; F, la statistique de Fisher; Sig. le niveau de significativité, NS:non significatif; *, **, *** significatif respectivement à un risque de 5%, 1% et 0.1%.

Le résultat de l'ANOVA (tableau 4) montre que l'effet génotype n'est significatif que pour TT_SF ce qui indique qu'il n'existe de la variabilité génétique entre les sept variétés étudiées que pour la durée «semis floraison», en accord avec la précocité des génotypes. L'effet environnement n'est significatif que pour TT_SL et TT_F. Le semis précoce n'induit de différences significatives que pour le temps thermique du semis à la levée et de la floraison à la récolte.

		TT_SL	TT_SF	TT_LF	TT_F	LAI-F	ei-F	TDM-F	IR	RDT
Semis Conventionnel										
Frankasol	Moy	110	1001	891	801	2.74	0.85	529	0.38	30.6
	ET	6	30	25	94	1.02	0.11	156	0.02	8.7
INRA6501	Moy	104	1005	901	871	3.69	0.93	831	0.29	27.8
	ET	1	32	32	53	0.98	0.05	195	0.04	7.9
Melody	Moy	104	1030	926	892	3.67	0.96	712	0.32	33.3
	ET	1	20	21	133	1.06	0.04	208	0.04	7.2
Mirasol	Moy	104	1010	906	809	3.78	0.95	824	0.34	33.2
	ET	1	28	28	68	0.88	0.04	342	0.02	9.8
Peredovik	Moy	104	1001	897	856	2.71	0.87	583	0.35	27.2
	ET	1	30	30	27	0.72	0.08	204	0.01	5.1
Prodisol	Moy	104	990	886	829	3.17	0.94	795	0.37	27.6
	ET	1	11	11	57	0.82	0.05	280	0.01	6.2
Vidoc	Moy	102	973	888	814	3.32	0.93	611	0.38	38.6
	ET	9	12	29	87	0.73	0.05	135	0.01	10.6
Total	Moy	105	1001	899	839	3.29	0.92	698	0.35	31.2
	ET	4	28	27	81	0.93	0.07	240	0.04	8.5
Semis Précoce										
Frankasol	Moy	116	1007	880	941	2.79	0.87	385	0.35	30.7
	ET	30	35	24	56	0.71	0.07	158	0.06	10.5
INRA6501	Moy	98	971	873	979	3.68	0.94	584	0.34	29.8
	ET	15	25	23	21	0.63	0.03	85	0.02	7.7
Melody	Moy	96	1028	931	1141	3.34	0.95	574	0.34	38.7
	ET	18	35	25	70	0.98	0.04	211	0.02	7.7
Mirasol	Moy	96	1030	934	945	4.84	0.98	667	0.34	29.7
	ET	16	30	19	40	0.56	0.01	215	0.04	7.7
Peredovik	Moy	94	986	892	1026	3.21	0.91	508	0.34	33.2
	ET	18	41	39	42	0.74	0.05	169	0.04	5.5
Prodisol	Moy	96	996	900	955	3.38	0.94	613	0.36	32.9
	ET	16	18	23	48	0.89	0.05	157	0.04	12
Vidoc	Moy	88	954	866	1048	3.56	0.93	528	0.35	33.9
	ET	18	40	47	63	1.13	0.05	121	0.04	10.6
Total	Moy	98	996	897	1005	3.5	0.93	547	0.35	32.7
	ET	20	41	38	83	0.96	0.06	179	0.04	9.1

Tableau 5 : Moyenne (Moy) et écart-type (ET) pour les variables observées en conditions de semis conventionnel et précoce pour sept variétés issues du progrès génétique. Les variables observées sont : le temps thermique du semis à la levée (TT_SL), le temps thermique du semis à la floraison (TT_SF), le temps thermique de la levée à la floraison (TT_LF), le temps thermique de la floraison à la récolte (TT_FR), la biomasse aérienne à la floraison (TDM-F), le LAI à la floraison (LAI-F), l'efficacité d'interception à la floraison (ei-F), le rendement à la récolte (RDT), l'indice de récolte (IR)..

Les résultats du tableau 5 montrent que le temps thermique nécessaire pour accomplir la phase « germination levée » est moins important en condition de semis précoces (98 °Cj en SP versus 105 °Cj en SC). Par contre le temps thermique nécessaire à la maturation des graines est plus important en condition de semis précoces. L'interaction G X E significative pour cette phase de développement indique que les différentes variétés ont des durées de maturation des graines qui varient en fonction de la date de semis et ne répondent pas de la même manière aux semis précoces (tableau 4). Le LAI comme l'efficacité d'interception du rayonnement à la floraison présente une variabilité génétique significative (tableau 4). On peut effectivement noter tableau 5 que Frankasol présente un LAI près de deux fois plus faible que Mirasol. Le fait d'avancer la date de semis n'influence pas la mise en place de la surface foliaire, puisque aucun effet significatif n'est observé ni pour le LAI ni pour l'efficacité d'interception. Dans les deux conditions de semis, le LAI est proche de 3.4 et l'efficacité d'interception est de 93 % (tableau 5).

La biomasse accumulée durant la phase végétative est variable d'une variété à l'autre et elle est aussi influencée par la date de semis (tableau 4). Le semis précoce induit une réduction de la biomasse à la floraison d'environ 20% chez les sept variétés étudiées.

La figure 15 montre que pendant les premiers stades de développement (jusqu'à 520°Cj après le semis) l'efficacité biologique est égale à un pour les trois dates de semis. C'est à partir de l'apparition du bouton floral (E1) que ϵ_b augmente rapidement. A la floraison, la biomasse accumulée en SP1 est très inférieure à celle accumulée en SP2 et SC (environ deux fois moins), et le couvert à intercepté moins de PAR. Les valeurs d'efficacité biologique observées à la floraison, qui intègrent toute la durée de la phase végétative, sont en moyenne pour tous les génotypes de 2.18 pour le semis avancé de 2 mois (SP1), 2.81 pour le semis avancé de 1 mois (SP2), et 2.59 pour le semis conventionnel (SC).

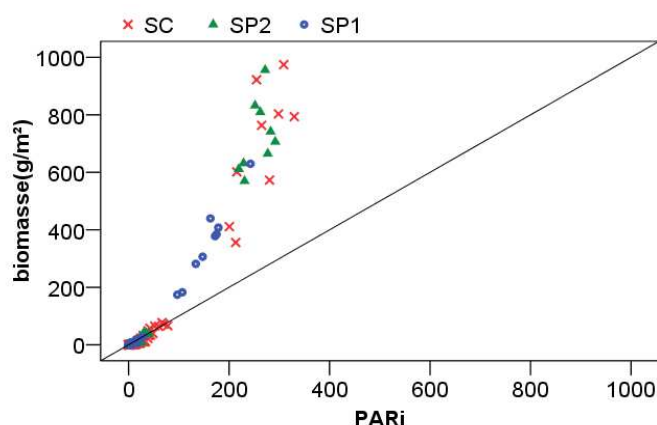


Figure 15: Relation entre la quantité de biomasse produite par m² de surface et la quantité de rayonnement photosynthétiquement actif intercepté par m² de couvert (PARi) de la levée jusqu'à la floraison. Le ratio biomasse/PARi correspond à l'efficacité biologique. Trois conditions de semis sont représentées: une date de semis conventionnelle (semis 3), une date de semis anticipée d'un mois (semis 2) et une date de semis anticipée de deux mois (semis 1)

Les résultats de l'ANOVA pour le rendement ne montrent pas d'effets « génotype » ni « environnement » significatifs (tableau 4). La moyenne du rendement en semis conventionnel est de 31.2 q/ha et varie de 27.2 à 38.6 q/ha selon les variétés, tandis qu'en semis précoces la moyenne est de 32.7 q/ha et varie de 29.7 à 38.7 q/ha. L'indice de récolte ne présente pas non plus d'effets « génotype » ni « environnement » significatifs, avec la même moyenne dans les deux conditions de semis. Par contre, on peut observer une interaction G X E significative pour cette variable. Le tableau 5 illustre que les variétés Frankasol, Peredovik, et Prodisol ont un IR qui diminue significativement en semis précoce par rapport au semis conventionnel alors qu'INRA6501 et Melody ont un IR qui augmente significativement (résultats du test post-hoc non présentés).

Evaluation de la qualité prédictive du modèle SUNFLO en conditions de semis précoce

Etant donné son formalisme initial, le modèle ne prend pas en compte de variabilité génétique pour simuler la date de levée. Dans un premier temps, pour éviter de biaiser les résultats des simulations par une mauvaise estimation de la phase « semis levée », la levée a été forcée. Les résultats, illustrés figure 16 –A, montrent que le temps thermique nécessaire pour atteindre la floraison est très bien prédit par le modèle en condition de semis conventionnel (SC), que ce soit en prenant en compte la levée (TT_SF) ou non (TT_LF). Le temps thermique pour atteindre la floraison est moins bien prédit en condition de semis précoce (SP), mais reste tout de même acceptable comme le montre la valeur du RRMSE-P qui est inférieure à 5% pour les deux variables TT_SF et TT_LF (tableau 6). La date de floraison est également très bien prédite par le modèle dans les deux conditions de date de semis, avec des valeurs de RRMSE-P inférieures à 2% dans les conditions de semis conventionnels et précoces (tableau 6).

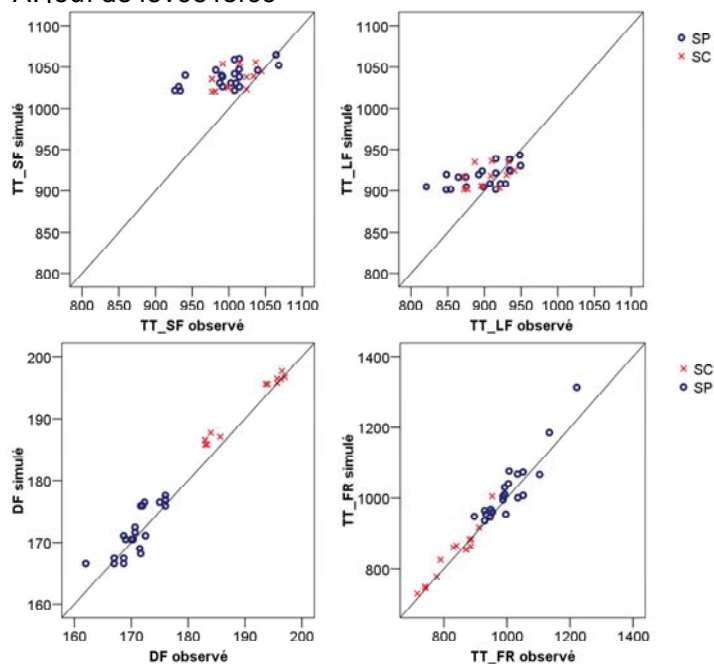
L'augmentation, en temps thermique, de la phase de maturation des graines observée en condition de semis précoce est également prise en compte par le modèle. Les valeurs du RRMSE calculées pour cette variable sont identiques pour les semis conventionnels et précoces (tableau 6) ce qui confirme la corrélation très forte observée (figure 16 –A) entre les valeurs observées et simulées.

Tableau 6 : Evaluation de la qualité de prédiction du modèle par le RRMSE-P (Relative Root Mean Square Error of Prediction) calculé pour des conditions de semis précoces (SP) et de semis conventionnels (SC) pour les différentes variables de sorties du modèle SUNFLO. Les variables observées sont : le temps thermique du semis à la levée (TT_SL), le temps thermique du semis à la floraison (TT_SF), le temps thermique de la levée à la floraison (TT_LF), le temps thermique de la floraison à la récolte (TT_FR), la biomasse aérienne à la floraison (TDM-F), le LAI à la floraison (LAI-F), l'efficacité d'interception à la floraison (ϵ_i -F), le rendement à la récolte (RDT), l'indice de récolte (IR).

	semis	JL	TT_SF	TT_LF	TT_FR	DF	TDM-F	LAI-F	ϵ_i -F	RDT	IR
levée forcée	SC	-	1.5	3.1	5.8	0.6	27	15.9	2.8	21	7.8
	SP	-	4	4.2	5.4	1.1	25.4	30.9	7.9	16.4	14.3
levée simulée	SC	2.7	3.7	2.9	2.6	1.2	26.9	15.6	2.7	21	8.8
	SP	6.3	5.2	3.9	3.9	1.4	24.8	30.3	8.1	16	15

Le modèle prédit une seule date de levée (JL) pour chaque date de semis pour les sept variétés étudiées, comme le montre la figure phénologie 16-A. Les valeurs observées montrent au contraire dans les conditions de semis précoces une variabilité génétique pour la date de levée. Le RRMSE-P montre que les erreurs de prédiction sont plus importantes dans le cas des semis précoces que dans les conditions de semis conventionnels avec un RRMSE-P deux fois supérieur en SP (tableau 6). La distribution des résidus (non illustrée) a révélé que le modèle surestime la date réelle de levée dans les conditions conventionnelles mais surtout dans les conditions de semis anticipés d'un mois. Néanmoins la prédiction de la date de levée par le modèle reste acceptable avec des RRMSE-P inférieurs à 10%. Le biais observé entre valeurs observées et prédites pour la date de levée en condition de semis précoces se répercute faiblement sur les autres variables phénologiques de pré-floraison. En effet, les valeurs de RRMSE sont légèrement plus élevées lorsque la date de levée est simulée, comme par exemple pour TT_SF qui passe de 1.5% à 3.7% en semis conventionnels (tableau 6). La variable TT_FR ne semble pas du tout affectée par le fait de forcer ou non la levée puisque les valeurs de RRMSE-P restent inférieures dans le cas où la levée n'est pas forcée. Quoi qu'il en soit, la non prise en compte de la variabilité génétique observée pour la date de levée au sein des sept variétés étudiées en condition de semis précoces n'entraîne pas de biais considérable dans les valeurs prédites par le modèle pour les autres variables phénologiques.

A: jour de levée forcé



B: jour de levée simulé

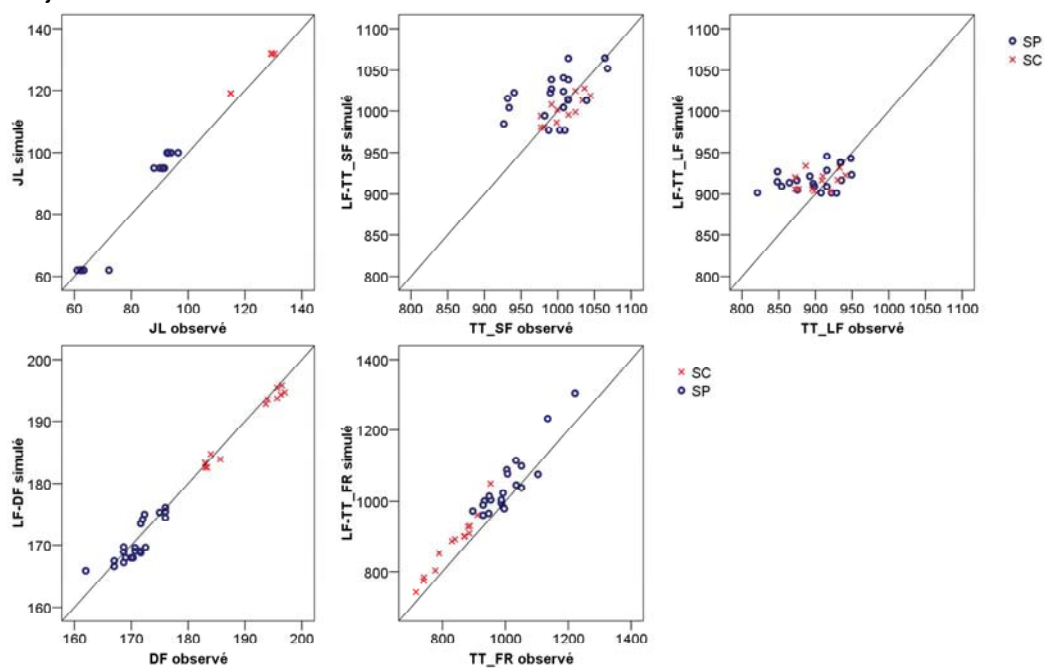


Figure 16 : prédiction de la phénologie: corrélations entre valeurs observées et prédites par simulation avec le modèle SUNFLO pour des conditions de semis précoces (SP) et de semis conventionnels (SC). A) valeurs simulées en forçant le modèle avec la date de levée observée (LF), B) valeurs simulées à partir de la date de semis. Les variables de sorties du modèle sont : le temps thermique du semis à la levée (TT_SL), le temps thermique du semis à la floraison (TT_SF), le temps thermique de la levée à la floraison (TT_LF), le temps thermique de la floraison à la récolte (TT_FR).

Afin d'éviter que d'éventuels biais liés à une mauvaise estimation de la phénologie ne se répercutent sur la croissance et le développement du couvert, toutes les valeurs simulées à partir de maintenant seront issues de simulations où la date de levée a été forcée.

Croissance et développement

Le LAI est deux fois mieux simulé dans le cas de semis conventionnels qu'en semis précoces comme le montrent les valeurs de RRMSE-P qui sont de 15% en SC et de 30% en SP (tableau 6). La corrélation entre les valeurs prédites et observées montre que le modèle sous-estime le LAI (figure 17). Le biais entre valeurs prédites et observées est très élevé pour deux points correspondants au même génotype (Mirasol) dans deux conditions de semis précoce différentes. La simulation de l'efficacité d'interception pour les semis conventionnels est très bonne avec un RRMSE de 2.7%, et comme le LAI, elle est meilleure en SC qu'en SP.

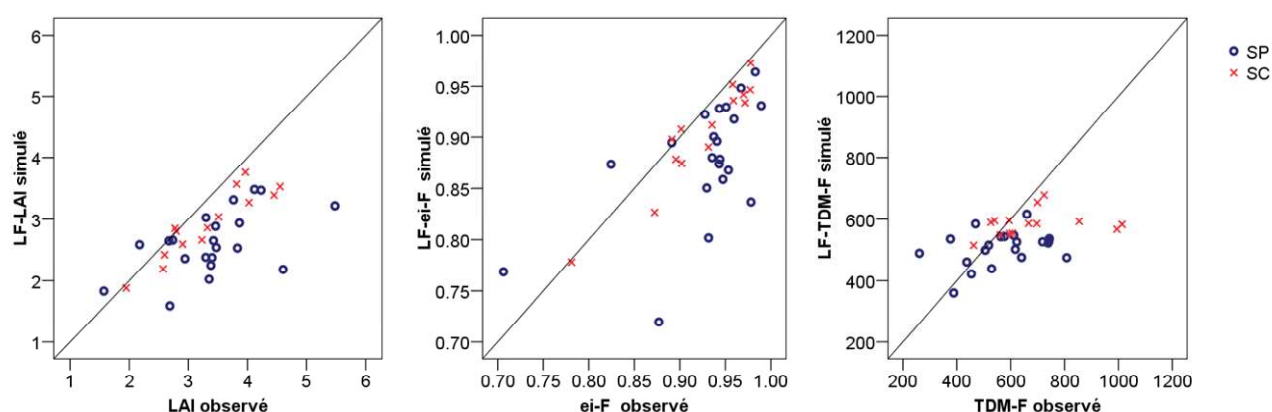


Figure 17: prédiction de la surface foliaire et de la production de biomasse : corrélations entre valeurs observées et prédites par simulation avec le modèle SUNFLO pour des conditions de semis précoces (SP) et de semis conventionnel (SC). Les simulations ont été réalisées en forçant la levée (LF). Les variables de sorties du modèle sont : le LAI à la floraison (LAI-F), l'efficacité d'interception à la floraison (ei-F) et la biomasse aérienne totale à la floraison (TDM-F).

D'une manière générale, le modèle a tendance à surestimer la quantité de biomasse accumulée pendant la phase végétative (TDM-F). Cette variable n'est pas mieux prédite en SP qu'en SC (figure 17). Les valeurs de RRMSE-P sont de l'ordre de 25% dans les deux conditions de date de semis (tableau 6). Les valeurs les moins bien prédites correspondent aux valeurs observées extrêmes (faibles ou fortes biomasses).

L'efficacité d'interception (ϵ_i) est surestimé par le modèle tandis que l'efficacité biologique (ϵ_b) est sous estimée (figure 18). La production de biomasse par contre semble correctement

prédite par le modèle. La figure 18 montre que ϵ_i est mieux simulée par le modèle en SC (RRMSE-P = 0.4), alors qu'en SP les valeurs simulées sont surestimées surtout dans les premiers stades de développement. La date de semis la moins bien simulée sur l'ensemble du cycle végétatif est SP1 avec un RRMSE-P de 0.68 contre 0.4 pour les deux autres dates. Le biais entre valeurs simulées et observées est moins important à la floraison. Le semis SP1 est celui qui montre le biais le plus important avec un RRMSE-P supérieur à 1.

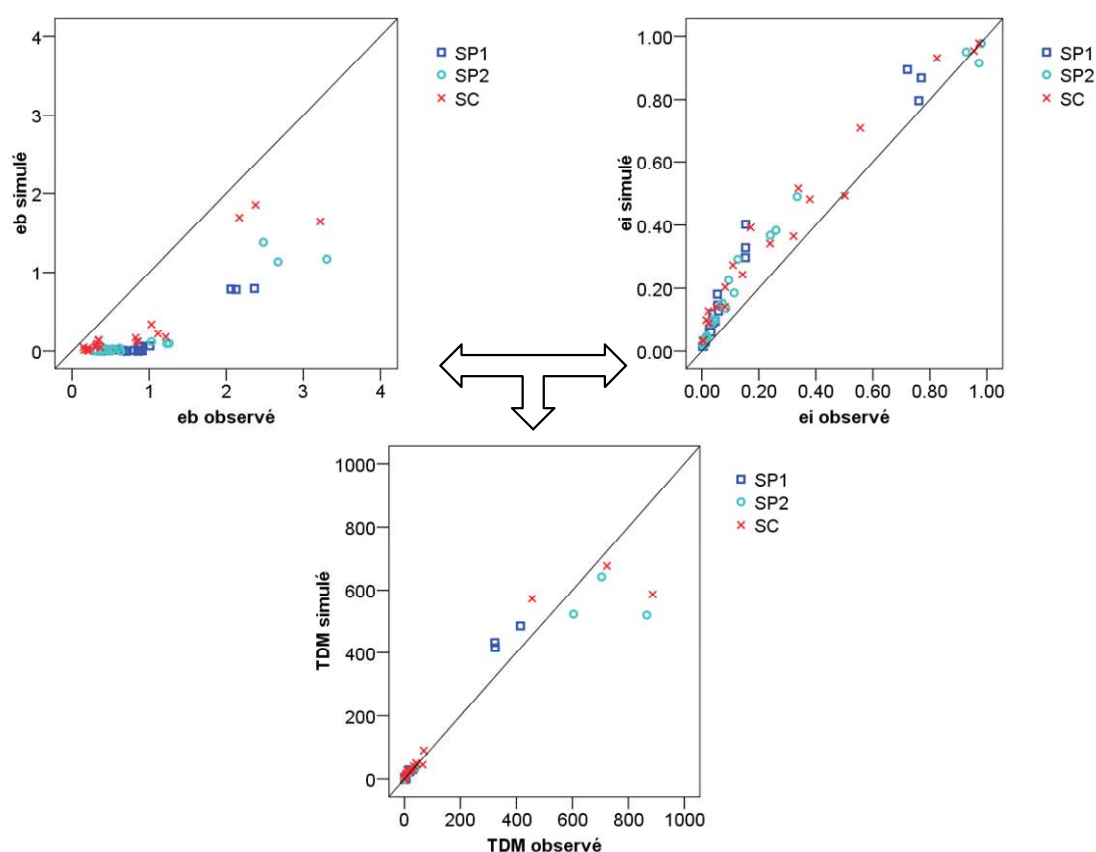


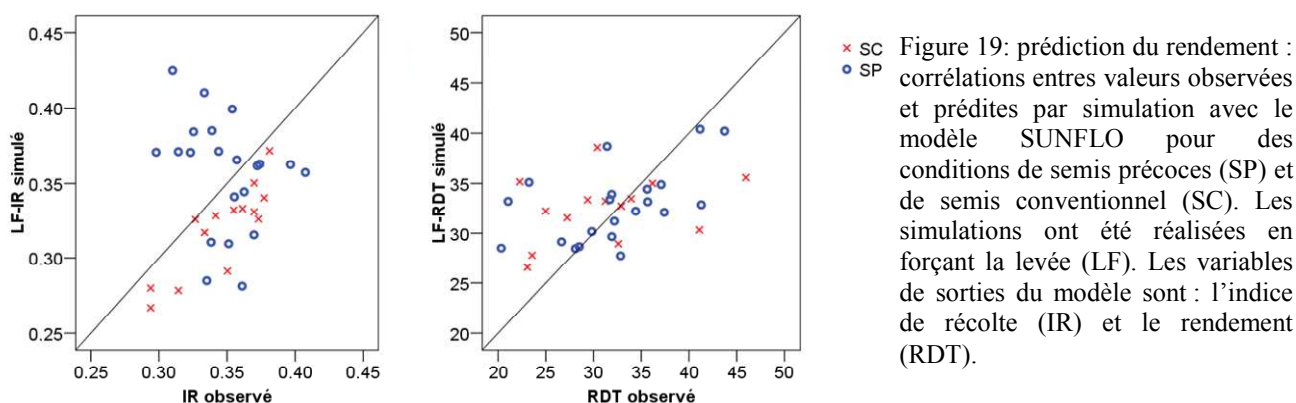
Figure 18: Evolution de la croissance entre le semis et la floraison pour l'efficacité biologique (ϵ_b), l'efficacité d'interception (ϵ_i), la biomasse par m² (TDM): corrélations entre valeurs observées et prédites par simulation avec le modèle SUNFLO pour des conditions de semis précoce (SP) et de semis conventionnel (SC).

Dans les trois conditions de semis, le modèle sous estime les valeurs d'efficacité biologique, surtout dans les premiers stades de développement, où l'efficacité biologique est la plus faible. Les valeurs prédites les plus proches de celles observées sont les valeurs d'efficacité biologique prédites à la floraison, avec des RRMSE-P à ce stade de 0.64 pour SP1, 0.58 pour SP2 et 0.38 pour SC contre des valeurs proches de 1 pour les stades précédents de développement. Une ANOVA à trois facteurs (stade, semis, génotype) a montré que les valeurs d'efficacité biologique observées n'étaient pas différentes selon les génotypes mais

présentaient des différences significatives entre les dates de semis et entre les stades de développement (résultats non présentés).

L'efficacité biologique n'est pas constante au cours du développement de la phase végétative, elle est réduite en condition de semis précoces et ne présente pas de variabilité génétique significative. Le modèle représente bien l'efficacité biologique à la floraison en semis conventionnel, mais dans les stades précoces et lorsque le semis est précoce, le modèle simule moins bien cette variable.

L'Indice de Récolte est mieux simulé par le modèle en SC qu'en SP, comme l'indiquent les valeurs du RRMSE-P (tableau 6), deux fois plus élevées en SP. La figure 19 montre que les valeurs de l'IR ont tendance à être surestimées dans le cas de SP_2mois et sous estimées en SC. Les valeurs du rendement par contre sont mieux simulées en SP qu'en SC (tableau 6).



4.1.2.4 Discussion : évaluation de SUNFLO en semis précoce

Effet du semis précoce sur les variables de sortie du modèle

Le rendement est la variable de sortie finale du modèle et il dépend de l'indice de récolte et de la production de biomasse. Avec des écarts moyens entre valeurs observées et simulées de 5 q/ha en SP et de 3.8 q/ha en SC, nos résultats s'inscrivent dans la précision permise par le modèle. L'erreur moyenne de prédiction est néanmoins plus importante en SP qu'en SC. Afin d'améliorer la prédiction, essayons de comprendre quelles sont les causes des erreurs sur les variables intermédiaires.

D'après le formalisme du modèle, l'indice de récolte dépend de la biomasse à la floraison (TDM-F) et du temps thermique nécessaire à la maturation (TT_FR). Nos résultats ont montré que la phénologie, et particulièrement la variable TT_FR, était très bien représentée par le modèle même lorsque le semis est avancé de deux mois (figure 16 et tableau 6). Par contre, nous avons observé une erreur de prédiction plus importante pour la production de biomasse. La biomasse au cours du temps est simulée dans le modèle à partir de l'efficacité biologique et de l'efficacité d'interception du PAR. Comment ces deux variables intermédiaires pourraient-elles être à l'origine du biais observé pour la production de biomasse ? La première, ϵ_b , représente la capacité de la plante à convertir l'énergie lumineuse en biomasse. La deuxième, ϵ_i , est fonction de la mise en place et de l'évolution de la surface foliaire au cours de la phase végétative (LAI) mais également de l'architecture du couvert résumée dans le modèle par le coefficient k de l'équation 13 (Lecoeur et Guillioni, 2005).

Nous avons montré que le modèle sous-estimait beaucoup la biomasse à la floraison (figure 17). Dans cette expérimentation, le modèle a également sous-estimé le LAI et l'efficacité d'interception (figure 17). Dans ce cas, nous pouvons supposer que c'est la sous-estimation de l'efficacité d'interception qui est à l'origine de la mauvaise prédiction de la biomasse à la floraison. Or l'efficacité d'interception est mieux prédite en SC qu'en SP : quels facteurs pourraient en être responsables ? Dans notre expérimentation, nous avons observé une densité de peuplement très faible et souvent irrégulière lors des semis précoces, avec parfois moins de 3 plantes par m^2 . Les faibles densités sont connues pour induire une augmentation de la surface foliaire par plante (Sadras et Hall, 1988). La production de biomasse est alors elle aussi affectée par de faibles densités de peuplement. La sous-estimation du LAI par le modèle peut donc s'expliquer par une mauvaise capacité à représenter les faibles densités. Nous avons constaté également que l'écart entre l'erreur de prédiction des semis précoces et celle des semis conventionnels était plus important dans le cas de l'efficacité d'interception que dans celui du LAI (tableau 6). La première raison possible est que l'efficacité d'interception étant une fonction exponentielle du LAI, les écarts d'erreurs de prédictions observées pour le LAI soient exacerbés par la fonction exponentielle. La deuxième raison possible serait due au coefficient k , qui intervient dans la relation entre ϵ_i et LAI, et à l'effet des basses températures sur l'architecture des plantes. Nous avons considéré le coefficient k comme constant au cours du développement végétatif et indépendant des conditions de semis. Or, nous avons pu observer lors de nos expérimentations une forte influence des basses températures sur l'architecture de la plante avec l'apparition de ramifications secondaires chez quelques

variétés. Ce phénomène a déjà été rapporté chez le tournesol dans le cas de semis d'hiver (Gimeno *et al.*, 1985). Nous pouvons donc supposer que si les basses températures peuvent provoquer de telles modifications architecturales, elles doivent également modifier le port des feuilles et plus exactement l'angle que celles-ci font avec la tige. Les résultats obtenus lors de la mesure de l'évolution de l'efficacité d'interception au cours du temps tendraient à confirmer cette hypothèse. Dans cette expérimentation, les densités de peuplement lors des semis précoces sont plus faibles que dans le semis conventionnel mais restent proche de 6 plantes/m². Dans ces conditions de densité, l'efficacité d'interception simulé a été surestimé par le modèle (figure 18). Ce résultat peut aussi s'expliquer par le fait que le coefficient k n'est pas constant au cours du cycle de développement. En effet, il a déjà été montré que chez le tournesol, le coefficient k variait avec la valeur du LAI (Orgaz *et al.*, 1992).

Il est important de noter que dans cette seconde expérimentation, où les densités de peuplement sont conformes à un semis classique de tournesol, les valeurs de biomasses prédites et observées sont très proches (figure 18). Cela suggère que le modèle est capable de bien représenter la production de biomasse au cours du temps même dans le cas de semis très précoces. Le principal facteur responsable d'une mauvaise estimation de la biomasse en condition de semis précoces serait donc la densité de peuplement, et les conséquences que cela a sur le LAI, qui est un paramètre très important dans le modèle. La prise en compte des basses températures dans SUNFLO à travers le module stress thermique (cf chapitre bibliographie) est donc suffisante pour rendre compte de l'effet des basses températures sur la croissance et le développement.

Par ailleurs, nos résultats dans le cadre de cette expérimentation ont montré que l'écart entre les valeurs observées et prédites pour le PAR_i et l'efficacité biologique était très important, surtout en condition de semis précoces. Etant donné que cet écart ne se retrouve pas pour la biomasse nous pouvons penser que cet écart est plutôt lié à une erreur dans l'estimation de ces paramètres lors des mesures plutôt que lors des simulations. Malgré tout, nous avons montré que les valeurs d'efficacité biologique autant observées que simulées diminuaient lorsque la date de semis était avancée de deux mois. Nous avons également montré que l'efficacité biologique est un paramètre qui n'est pas significativement différent entre génotypes ce qui correspond également aux hypothèses du modèle actuel. Mais nos résultats concernant la mesure de l'évolution pourraient remettre en cause la courbe d'efficacité biologique potentielle utilisée dans SUNFLO. En effet, la figure 18 révèle bien que les valeurs d'efficacité biologique dans les premiers stades de développement sont inférieures à 1, alors

que l'efficacité biologique potentielle dans le modèle est égale à 1 pendant les premières phases de croissance.

L'estimation de l'efficacité biologique dans le modèle ne semble pas être responsable du biais dans la prédiction de la biomasse en condition de semis précoce. Cela veut dire que le module de stress thermique dans le modèle permet, en l'état, de rendre compte de l'effet des basses températures sur la photosynthèse. Cela veut dire par ailleurs que les erreurs de prédiction pour la biomasse dans le cas de semis précoces ont pour origine principale l'estimation de l'efficacité d'interception. Une mauvaise estimation de l'efficacité d'interception a deux raisons possibles dans le cas d'un semis précoce: la principale est liée à la forte réduction de la densité de peuplement et la seconde à une évolution du coefficient k au cours du développement végétatif. Le formalisme du modèle doit donc être amélioré pour mieux représenter les faibles densités. L'effet des basses températures associées aux semis précoces est, quant à lui pris en compte de façon satisfaisante dans le formalisme existant.

Effet du semis précoce sur la représentation des interactions $G \times E$

Les basses températures, comme la plupart des stress, ont pour effet de mettre en évidence une variabilité génétique non exprimée en condition optimale. Dans des conditions contrastées, la capacité de représenter la diversité des réponses génotypiques, pour un caractère donné, fait la spécificité du modèle SUNFLO. Quelles variables ont révélé une variabilité génétique dans des conditions de semis précoces non exprimée dans le formalisme du modèle ? En termes de croissance (production et allocation de la biomasse), le modèle permet de rendre compte de la variabilité génétique observée par le biais de paramètres génotypiques. Ces derniers (paramètres d'architecture, de réponse au stress hydrique, d'élaboration du rendement ou de la teneur en huile) associés au module de stress thermique, suffisent à rendre compte de la variabilité génétique et des interactions avec l'environnement dans le cas de semis précoces. Nous avons montré que la phénologie était représentée de manière satisfaisante par le modèle, même en condition de semis précoces. Les paramètres génotypiques relatifs à la phénologie ne prennent en compte que la variabilité génétique post-émergence. Or, en condition de basse température, la phase de levée est la phase de développement la plus soumise aux contraintes des basses températures. L'étude des sept variétés n'a pas permis de mettre en évidence une variabilité génétique significative pour la variable TT_SL (temps thermique nécessaire pour la levée) (tableau 4). Pourtant, les écarts

observés entre les sept variétés pour cette variable sont de 40°Cj ce qui correspond à une différence de 11 jours. Cette variabilité génétique pour la phase « semis levée » est beaucoup plus importante si l'on considère les vingt variétés issues du progrès génétique. Qu'en serait-il sur une gamme de génotypes présentant une base génétique encore plus large ? Dans le modèle, le temps thermique pour la levée est un paramètre de l'espèce ; quelles seraient les conséquences sur les valeurs prédites en conditions de semis précoces si le temps thermique pour la levée était un paramètre génotypique ? Etant donné que l'objectif du semis précoce est d'avancer la date de floraison, le gain de temps pendant la levée n'est pas négligeable. Il apparaît donc pertinent d'introduire dans le modèle un paramètre génotypique relatif à la phase de levée pour améliorer la représentation des interactions G X E. Cela implique d'abord d'évaluer l'impact que cela aura sur les autres variables du modèle.

Le module de stress thermique permet au modèle de bien rendre compte de l'effet des basses températures occasionnées par le semis précoce sur la croissance et le développement. A partir de la gamme de variabilité génétique étudiée ici, nous pourrions conclure que le modèle ne nécessite pas d'améliorations pour représenter les semis précoces. Avancer la date de semis d'un à deux mois a de fortes répercussions en termes de densité de peuplement ce qui semble être à l'origine des biais observés entre valeurs observées et simulées pour le LAI et donc pour la production de biomasse. C'est donc plus la représentation des faibles densités qui mériterait d'être améliorées dans le modèle plutôt que l'effet des basses températures.

La production de biomasse journalière dépend de paramètres génotypiques notamment architecturaux comme la surface et la position de la plus grande feuille, le nombre maximal de feuilles ou le coefficient k qui entre en compte dans le formalisme de l'efficacité d'interception du PAR. Ces paramètres génotypiques permettent de représenter de façon satisfaisante la variabilité génétique observée pour la production de biomasse à basse température. Est-ce qu'il serait possible d'améliorer encore la qualité prédictive en prenant en compte la variabilité génétique observée à basse température pour la phase « semis levée » ?

4.1.3 Simulation de scénarii de semis précoces avec des génotypes virtuels

4.1.3.1 Introduction

Dans le cadre de l'utilisation des modèles pour l'aide à la conception et à l'évaluation d'innovations techniques en production végétale, certains modèles agronomiques sont utilisés comme outils d'aide à la conception de nouveaux systèmes techniques ou comme outils d'aide au pilotage des cultures (Jeuffroy *et al.*, 2008). Dans le cas du tournesol, plusieurs modèles ont déjà été construits et utilisés pour évaluer l'effet de différentes pratiques et facteurs abiotiques sur la productivité. Par exemple, (Meinke *et al.*, 1993) ont cherché à identifier par simulation les facteurs potentiels (date de semis, statut hydrique du sol au moment du semis, précocité de la variété) permettant de minimiser les risques de fluctuations de la production sur plusieurs sites Australiens. A l'aide du modèle EPICphase, Cabelguenne *et al.* (1999) ont cherché à évaluer l'effet du manque d'eau et d'azote en fonction des stades de développement sur la production de biomasse et le rendement. Pereyra-Irujo et Aguirrezábal (2007), à travers un modèle simulant le rendement et la qualité de l'huile du tournesol, ont analysé les interactions entre ces deux traits et leur variabilité en fonction du site, de l'année et de la date de semis en Argentine.

C'est en utilisant le modèle SUNFLO (Casadebaig, 2008) que nous nous proposons d'évaluer les possibilités de semis précoces (anticipés d'un mois et demi et deux mois et demie par rapport à la date de semis conventionnelle) en supposant que le semis précoce pourrait permettre d'esquiver les périodes de sécheresses estivales. L'objectif est d'explorer les réponses en termes de croissance (productivité) et de développement (phénologie) de différents idéotypes en fonction de la date de semis dans le cas de 25 séquences climatiques. Les idéotypes testés sont des variétés virtuelles élaborées à partir de la variabilité génétique observée pour la levée et la précocité du cycle parmi vingt variétés.

Dans SUNFLO, comme dans tous les modèles de culture de tournesol existants, le paramétrage pour simuler la levée considère une température de base pour la levée égale à la température de base pour la croissance. De plus, cette température de base est variable d'un modèle à l'autre, elle peut être de 6°C (Pereyra-Irujo et Aguirrezábal, 2007), 4°C (Agüera *et al.*, 1997; Villalobos *et al.*, 1996), ou de 4.8°C dans le cas de SUNFLO (Casadebaig, 2008). Or comme nous l'avons montré précédemment, il existe une variabilité génétique pour la durée de levée, particulièrement marquée dans le cas de semis précoces associés à des basses températures en début de cycle. Il est donc important de caractériser la température de base de

levée pour représenter correctement la phénologie des variétés dans SUNFLO. Angus (1980) a estimé une température de base spécifique pour la levée au champ du tournesol à 7.9°C, mais dans le cas de semis précoce et de levée à basse température cette température apparaît beaucoup trop élevée. La levée se décompose en deux processus distincts : la germination et l'élongation de l'hypocotyle. (Wanjura *et al.*, 1970) a calculé les températures de base de ces deux processus chez le coton en modélisant la réponse des vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle à la température. En se basant sur cette méthode, la première étape de cette étude va consister à mesurer ces températures de base, d'évaluer la variabilité génétique de ces paramètres et de modifier le formalisme de SUNFLO afin de prendre en compte cette source de variabilité pour la levée. La sensibilité du modèle à ces nouveaux paramètres sera évaluée pour les principales variables de sortie qui nous intéressent : la phénologie (date de floraison et de maturité) et la productivité (rendement et indice de récolte). Cette analyse de sensibilité sera menée en incluant les différentes combinaisons possibles en termes de longueur de cycle pour trois dates de semis sur 25 séquences climatiques. Le but est de mettre en évidence l'effet du semis précoce en fonction des différents idéotypes variétaux afin d'identifier le ou lesquels sont les mieux adaptés à un scénario de semis précoce comme stratégie d'esquive de la sécheresse.

4.1.3.2 Matériels et méthodes

Matériel végétal et conditions expérimentales pour la mesure des paramètres de levée

Afin d'augmenter la base génétique des caractères étudiés, les vingt variétés paramétrées dans SUNFLO ont été utilisées dans le cadre de cette expérimentation. Ces variétés représentent le progrès génétique de 1960 à 2000.

L'objectif étant de caractériser les paramètres de germination et de croissance de l'hypocotyle à basse température, les graines des vingt variétés ont été mises à germer dans des incubateurs à : 3°C, 4.6°C, 7°C, 10°C et 12°C. Après avoir été désinfectées, les graines ont été mises en culture en boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) dans des conditions stériles puis placées dans les incubateurs. Pour chaque condition de température, 20 graines par variété ont été suivies (4 graines par boîte x 6 boîtes).

Le nombre de graines germées dans chaque boîte de Pétri a été suivi quotidiennement. La durée de germination (en nombre de jours du semis à la germination) est fixée lorsque 50 % des germes sont apparus. La vitesse de germination a été calculée (par boîte) comme l'inverse

de la durée de germination. La relation entre vitesse de germination et température a été modélisée pour chaque variété à partir d'une régression linéaire¹ selon l'équation 18 où a et b sont deux paramètres constants.

$$\text{Vitesse de germination} = a_1 \cdot \text{Température} + b_1 \quad (\text{équation 18}) \quad \text{et} \quad TbG = -\frac{b_1}{a_1}$$

La température de base de germination (TbG), est définie comme la température pour laquelle la vitesse de germination est nulle et se calcule donc à partir des deux paramètres a_1 et b_1 .

L'élongation de l'hypocotyle a été mesurée par boîte à deux dates, d90 et d120, correspondant à 90°Cj et 120°Cj après la germination. La vitesse moyenne d'élongation (mm/jour) a été calculée comme la différence d'élongation entre d120 et d90 divisée par la durée en jours (soit 30).

Comme pour la vitesse de germination, la relation entre la vitesse d'élongation de l'hypocotyle et la température a été décrite par une régression linéaire (équation 19) qui permet de calculer la température de base pour l'élongation de l'hypocotyle (TbG)

$$\text{Vitesse d'élongation de l'hypocotyle} = a_2 \cdot \text{Température} + b_2 \quad (\text{équation 19}) \quad \text{et} \quad TbE = -\frac{b_2}{a_2}$$

Les deux nouveaux paramètres TbG et TbE ont été ajoutés au modèle ce qui a permis de calculer deux nouvelles variables : la température efficace de germination (TeffG) et la température efficace d'élongation de l'hypocotyle (TeffE). Etant donné que nous nous plaçons sur des séquences climatiques froides pour lesquelles les températures négatives existent, nous avons rajouté une contrainte pour le calcul de toutes les températures efficaces (y compris Teff, la température efficace de croissance) : si la température moyenne est inférieure à 0°C nous considérons les températures efficaces comme nulles. Nous ne prenons donc pas en comptes les dégâts éventuels causés par le gel sur la culture.

A partir du formalisme déjà existant, la phase « semis levée » a été découpée en deux phases distinctes : semis-germination et germination-levée. Le temps thermique pour atteindre la germination est toujours de 86 °C mais il est calculé maintenant sur la base de TbG. Le temps thermique de la germination à la levée est le même que le formalisme initial, (fonction de la profondeur du semis multiplié par 1.19) mais calculé sur la base de TbE.

¹ La régression linéaire était celle qui permettait le meilleur ajustement parmi tous les modèles testés

Génotypes virtuels et simulation de scénarios de semis précoces

Afin d'étudier l'effet de ce nouveau paramétrage sur les variables de sortie du modèle, nous avons considéré trois combinaisons possibles de génotypes afin d'explorer toute la gamme de variabilité génétique observée pour TbG et TbE :

- une combinaison simulant la levée la plus précoce (Tb-L min = TbG et TbE minimum)
- une combinaison simulant une levée moyenne (Tb-L moy = TbG et TbE moyen),
- une combinaison simulant une levée tardive (Tb-L max = TbG et TbE maximum).

Nous avons associé ces trois combinaisons à la levée à des précocités différentes pour la floraison en se basant sur la gamme de variabilité génotypique au sein des 20 variétés étudiées. Nous avons reconstitué une variété dite « moyenne » à partir de la moyenne des 20 variétés pour chaque paramètre de croissance et de développement, une variété dite « précoce » qui présente les paramètres de phénologie de la variété la plus précoce et une variété dite « tardive » qui présente les paramètres de phénologie de la variété la plus tardive. Pour ces deux variétés, les autres paramètres de croissance sont identiques à ceux de la variété « moyenne »

Chaque variété virtuelle a été soumise à 3 dates de semis : le 14 avril pour le semis conventionnel (SC), le 1^{er} février pour le premier semis précoce (SP1) et le 1^{er} mars pour le second semis précoce (SP2), sur 25 ans de climat à Auzeville (1981 à 2005). L'ensemble des simulations réalisées sont résumées tableau 7.

Les variables de sortie simulées correspondantes sont : la date de floraison, la date de maturité, le rendement et l'indice de récolte.

Tableau 7 : Récapitulatif des combinaisons réalisées pour les simulations de scénarios de semis précoces.

paramètre de levée		variété		date de semis	années de simulation	nombre totale de simulation
Tb-L moy (TbGmoy+TbEmoy)		moyenne		SC		
Tb-L min (TbGmin+TbEmin)	X	précoce	X	SP1	X de 1981 à 2005	= 675
Tb-L max (TbGmax+TbEmax)		tardive		SP2		

4.1.3.3 Résultats

Gamme de variabilité génétique pour les paramètres de levée

Le suivi de la germination et de l'élongation de l'hypocotyle ont montré que ces deux processus physiologiques sont maintenus à 3°C pour toutes les variétés étudiées. Ce résultat prouve que la température de 4.8°C comme température de base pour simuler la levée est trop sévère. La modélisation des vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle en fonction de la température ont révélé que les vingt variétés étudiées présentaient une variabilité de réponse à la température, pour TeffG et (ou) pour TeffE. La figure 20 qui représente des variétés contrastées pour la réponse à la température illustre ces différences.

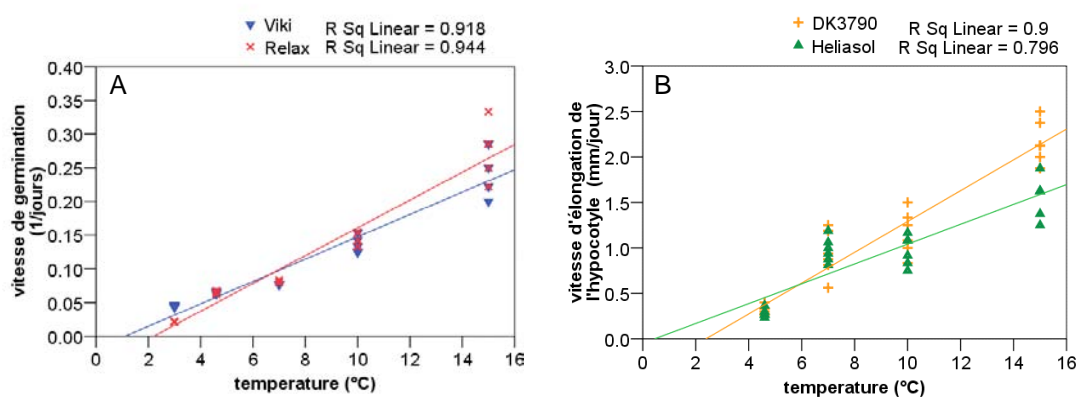


Figure 20: réponse à la température de la vitesse de germination (A) et de la vitesse d'élongation de l'hypocotyle (B) pour des variétés contrastées. L'interception de la droite de régression avec l'axe des abscisses correspond à la température de base. La valeur du coefficient de régression pour chaque variété est indiqué R Sq Linear.

Dans le cas d'une température moyenne de 10°C, cette différence de 3°C s'exprime par un écart de 9 jours entre la durée de levée prédite avec le formalisme actuel (23 jours) et la durée de levée prédite avec les nouveaux paramètres de levée TbG et TbE moyens (14 jours).

L'écart obtenu entre les variétés pour TbG est de 1.4°C, et pour TbE de 2.5°C (tableau 8). Ces différences génotypiques paraissent faibles et ne sont d'ailleurs pas significative (test LSD de Tuckey). A 10°C, elles correspondent à un écart de seulement 3 jours entre la variété la plus lente et la plus rapide. C'est à très basses températures (5°C°) que la variabilité génétique s'exprime fortement avec un écart potentiel de 20 jours.

Tableau 8: Variabilité génétique (moyenne \pm écart type) observée pour les paramètres TbG (température de base de germination) et TbE (température de base d'élongation) et les coefficients a_1 , a_2 , b_1 et b_2 .

	paramètres	moyenne	min	max	tuckey LSD test
température de base de germination (°C)	b_1	0.019	0.017	0.023	NS
	a_1	-0.035	-0.059	-0.018	*
	$-b_1/a_1 = TbG$	1.7 \pm 0.42	1.104	2.550	NS
température de base d'élongation de l'hypocotyle (°C)	a_2	0.134	0.100	0.180	NS
	b_2	-0.157	-0.460	0.096	*
	$-b_2/a_2 = TbE$	1.02 \pm 0.85	0.000	2.549	NS

Analyse de sensibilité du modèle en réponse à l'insertion de paramètres génotypiques pour la levée

Les variables de sortie du modèle (date de floraison, date de maturité, rendement et indice de récolte) sont présentées figure 21 en fonction de chaque génotype virtuel issu des différentes combinaisons [paramètres de levée x précocités de floraison]. La variabilité des réponses liée au climat est observée à travers les 25 années de simulation.

On observe tout d'abord que les valeurs médianes ainsi que la variabilité observée pour les variables de sortie ne sont pas affectés par les différences de température de base de levée (TbL), quel que soit la variété et la date de semis. La prise en compte de la variabilité génétique mise en évidence au sein des 20 variétés étudiées n'a donc pas d'effet sur les variables de sortie du modèle.

Au niveau de la phénologie, les variétés « précoce » et « moyenne » ont des dates de floraison et de maturité assez proches (figure 21-A et B). La floraison de la variété « tardive » à lieu entre 5 et 10 jours après celle des variétés « précoce » et « moyenne ». Quant à la date de maturité, elle est décalée de plus d'un mois pour la variété « tardive » par rapport aux deux autres.

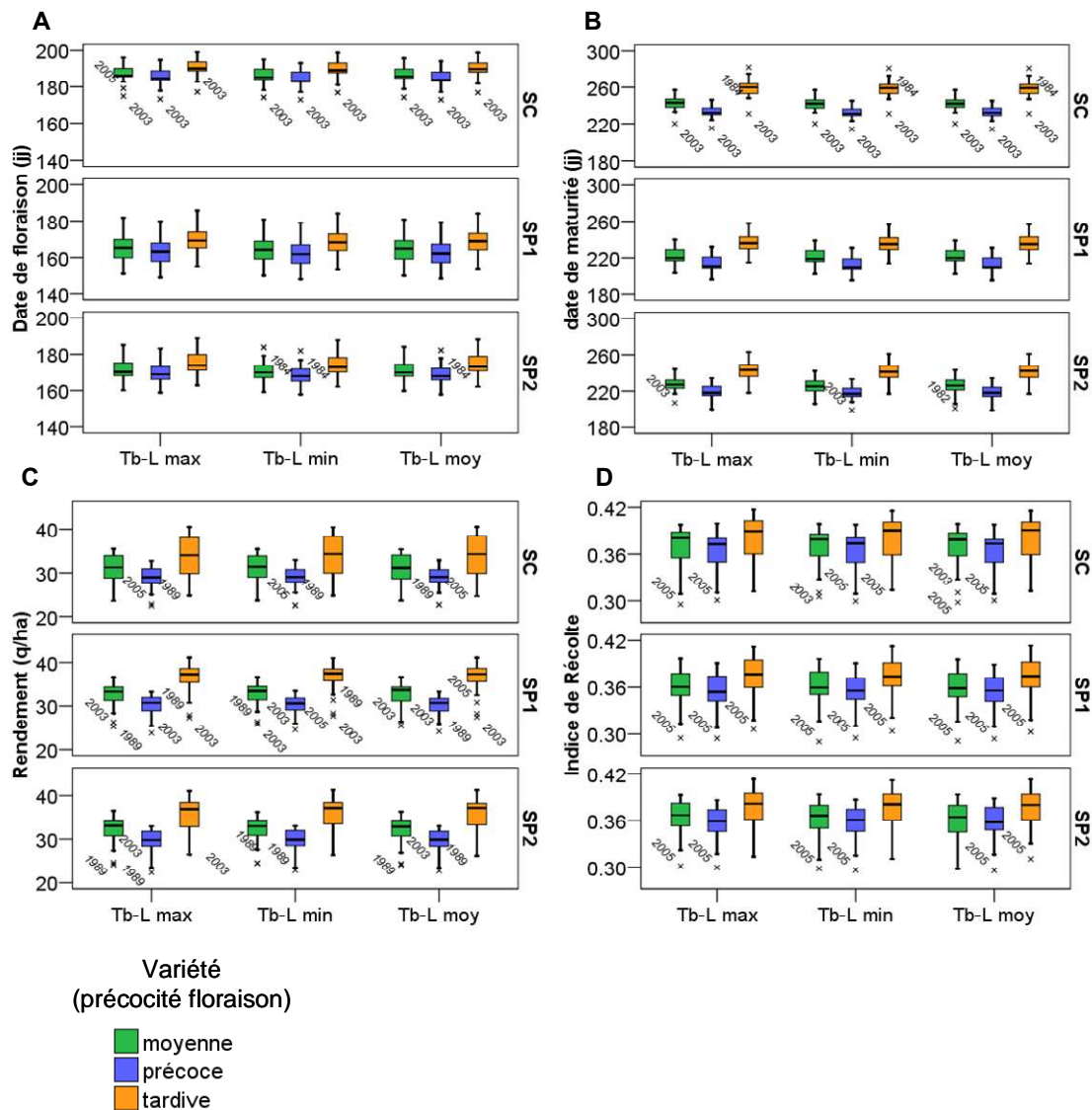


Figure 21 : Représentation de la réponse des différents **génotypes virtuels** A) pour la date de floraison, B), pour la date de maturité, C) pour le rendement et D) pour l'indice de récolte. Résultats obtenus à partir du modèle SUNFLO sur 25 séquences climatiques correspondant aux années 1981-2005. La barre centrale représente la valeur médiane, la boîte représente les 25^{ème} et 75^{ème} centiles et la moustache le minimal et le maximal à l'intérieur de 1.5 boîtes.

Le rendement et l'indice de récolte sont plus élevés chez la variété « tardive », avec un gain de 5 q/ha par rapport à la variété « précoce ». La variété « moyenne » a un rendement supérieur à la variété « précoce », en dépit d'un indice de récolte similaire (figure 21-C et D). En effet, la variété « précoce » a accumulé moins de biomasse durant la croissance végétative que la variété « moyenne ». Toutes variétés confondues, on constate que la date de semis influence beaucoup les dates de floraison et de maturité (figure 21-A et B). Le semis conventionnel (SC) fleurit pendant les quinze premiers jours de Juillet avec une maturité qui s'étale de début Août pour la variété « précoce » à début Octobre pour la variété « tardive ». Le semis précoce du 1^{er} février (SP1) fleurit pendant tout le mois de Juin, et celui du 1^{er} mars

(SP2) de mi-Juin à mi-Juillet. Les deux semis précoces ont une maturité physiologique qui s'étale de mi-Juillet à mi-Septembre, soit environ un mois avant SC (figure 21-A et B). On peut également observer sur cette figure qu'en fonction des années, il y a moins de variabilité en SC qu'en semis précoces pour la réalisation des stades. L'année 2003 se révèle être une année où les dates de floraison et de maturité ont été particulièrement précoces par rapport aux autres années pour SC mais pas pour les conditions SP. L'effet de la date de semis sur la productivité est moins marqué que sur la phénologie. On constate néanmoins une augmentation du rendement de 2 q/ha quand le semis est précoce de deux mois. La variabilité entre années est plus importante dans le cas du SC que dans les semis précoces (figure 21-C). Cette différence de variabilité entre années en fonction de la date de semis s'exprime particulièrement pour la variété « tardive ». L'indice de récolte ne semble pas influencé par la date de semis et varie dans tous les cas entre 0.31 et 0.41.

Effet de la date de semis et de la variété sur l'intensité du stress hydrique

La figure 22 représente les valeurs de l'indice de stress hydrique (ISH) prédites chaque année de 1981 à 2005 pour les trois phases de développement de la culture : croissance végétative (levée-début floraison), floraison et remplissage du grain. Les trois variétés virtuelles « précoce », « moyenne » et « tardive » ont été incluses dans l'analyse, en considérant des paramètres de levée moyens (TbL-moy) puisque nous avons montré que ces paramètres n'avaient pas d'influence sur les variables prédites par le modèle. Pendant la croissance végétative, les stress hydriques, observés pour le semis conventionnel (SC), sont considérablement réduits en semis précoce surtout pour la variété « tardive » (figure 22-A).

Pendant la floraison, le semis précoce, permet quand la variété est « tardive », de minimiser le stress hydrique par rapport à SC (figure 22-B). Cependant en 1998, les semis précoces présentent un ISH supérieur à celui du SC. On retrouve ce phénomène en 2004, en 1999 et en 1989 pour les variétés « précoce » et « moyenne ». Hormis l'année 1998, les stress les plus sévères, qui ont eu lieu pendant la floraison dans des conditions de semis conventionnels (2005, 2003, 1986, 1984 et 1982), n'auraient pas eu lieu ou auraient été considérablement réduits dans le cas de semis précoces avec une variété tardive (figure 22-B). Contrairement à ce qu'il en est pour les phases de croissance végétative et de floraison, le stress hydrique est accentué par le semis précoce pendant la phase post-floraison (figure 22-C). Ainsi, excepté en

1990 et 2003, ISH est très supérieur en SP1 et SP2 par rapport à SC, et ce, quelque soit le génotype testé.

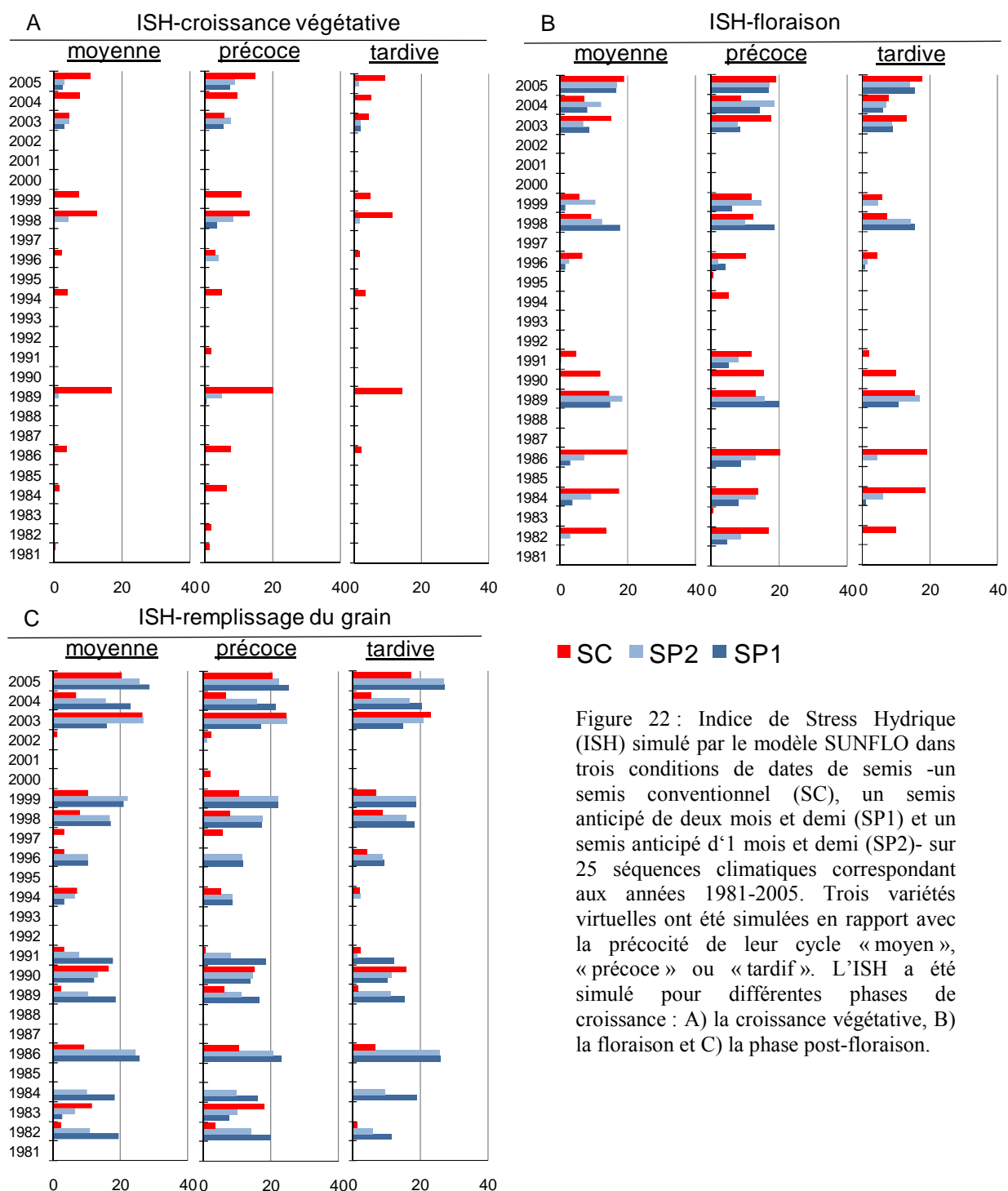


Figure 22 : Indice de Stress Hydrique (ISH) simulé par le modèle SUNFLO dans trois conditions de dates de semis -un semis conventionnel (SC), un semis anticipé de deux mois et demi (SP1) et un semis anticipé d'1 mois et demi (SP2)- sur 25 séquences climatiques correspondant aux années 1981-2005. Trois variétés virtuelles ont été simulées en rapport avec la précocité de leur cycle « moyen », « précoce » ou « tardif ». L'ISH a été simulé pour différentes phases de croissance : A) la croissance végétative, B) la floraison et C) la phase post-floraison.

Effet du stress hydrique sur le rendement

Une régression multifactorielle a permis d'établir la relation entre la valeur du rendement et l'intensité du stress hydrique selon la période pendant laquelle se déroule le stress. Le tableau 9 indique les valeurs des coefficients de régressions pour trois génotypes virtuels.

tableau 9 : Regression multifactorielle entre le rendement et l'intensité du stress hydrique (ISH) pour les trois périodes :croissance végétative, floraison et remplissage du grain. Une régression a été réalisée pour chacun des trois génotypes virtuels différant par leur phénologie (moyenne précoce, ou tardive) . Les régressions ont été réalisées à partir de données obtenues par simulation pour trois conditions de dates de semis -un semis conventionnel, un semis précoce de deux mois et demi et un semis précoce de 1 mois et demi - sur 25 séquences climatiques correspondant aux années 1981-2005. Seules les valeurs des coefficients de régressions significatives

variété	constante	coefficient de régression			R ²
		ISH- croissance végétative	ISH- floraison	ISH- remplissage du grain	
<i>moyenne</i>	33.9	-0.423	-0.232	-0.073	0.67
<i>précoce</i>	30.7	-0.309	-0.267		0.58
<i>tardive</i>	38.5	-0.501	-0.253	-0.081	0.78

Ce tableau permet de mettre en évidence le poids de chaque période de stress sur le rendement en fonction de la précocité de la variété. Ce résultat montre que quel que soit le type variétale, c'est pendant la croissance végétative que le stress hydrique a le plus d'impact sur le rendement. L'effet du stress hydrique pendant la période de remplissage du grain est très peu marqué, il n'est même pas significatif dans le cas de la variété précoce. Les valeurs de R² indiquent que les stress hydriques expliquent pour une bonne partie (plus de 50%) des écarts de rendements observés.

4.1.3.4 Discussion

Sensibilité du modèle pour la levée sur les autres paramètres

Contrairement à ce qui est considéré dans la littérature (Angus *et al.*, 1980; Casadebaig, 2008; Villalobos *et al.*, 1996), nous avons montré que les températures de base pour la germination et l'élongation de l'hypocotyle étaient inférieures à 3°C pour le tournesol et variaient avec le génotype (de 1.1°C à 2.5°C). Cependant, le faible nombre de variétés étudiées (20) n'a pas permis de mettre en évidence une variabilité significative. La modification de ce paramètre par rapport au formalisme initial du modèle SUNFLO permet d'améliorer sensiblement la prédiction de la date de levée dans des conditions de très basses températures (inférieures à 6°C) mais ne constitue pas un apport majeur dans des gammes de températures standards pour la culture du tournesol. De plus, au vu de nos résultats, il ne semble pas utile d'intégrer la variabilité génétique observée pour les paramètres de levée dans le modèle puisque cela n'a pas d'effet sur les principales variables de sortie en condition de semis habituelles. Cependant, dans le cas de semis d'hivers (anticipés de plus de deux mois par rapport à la date

traditionnelle), voire même dans le cas de semis d'automne comme cela a déjà été testé en Espagne, il sera important de prendre en compte cette source de variabilité. L'exploration d'une base génétique plus large pourrait peut-être permettre d'identifier des différences génotypiques significatives pour les paramètres caractérisant la levée chez le tournesol.

Effet du semis précoce sur le rendement : disponibilité en eau et esquivance de la sécheresse

Les simulations de semis précoces associés à des types variétaux plus ou moins précoces réalisées sur 25 séquences climatiques (de 1981 à 2005) ont permis de confirmer que le semis précoce d'un à deux mois permettait d'augmenter la productivité de la culture du tournesol. Ce résultat confirme ceux obtenus par d'autres modèles dans des conditions climatiques bien différentes (Sadras et Hall, 1989). Nos résultats suggèrent que l'augmentation du rendement dans le cas de semis précoce est liée à une meilleure disponibilité en eau à des stades clés du développement de la culture : la croissance végétative et la floraison. En effet la figure 22 montre bien que le nombre de jours de stress hydriques pendant la croissance végétative est quasiment nul dans le cas des semis précoces alors que certaines années (1989, 1998, 1999, 2004 et 2005), les cultures semées mi-Avril ont subi des stress hydriques marqués. De plus le tableau 9 met en évidence qu'il existe une relation forte entre l'intensité du stress hydrique pendant la phase de croissance végétative et une diminution du rendement. Le semis précoce permet donc, en évitant les stress hydrique pendant la phase de croissance végétative de maximiser la production de biomasse.

Nos résultats ont également montré que les stress hydriques qui peuvent survenir pendant la floraison étaient considérablement réduits quand le semis est avancé d'au moins un mois et demi (figure 22). Or c'est pendant cette phase de développement que le manque d'eau a le plus fort impact sur le rendement (tableau 9). Ainsi le semis précoce permet d'éviter, dans la majorité des cas, les périodes de déficit hydrique, critiques pendant la floraison (Robelin, 1967). Cependant, si le semis précoce permet l'évitement de stress hydrique jusqu'à la fin de la floraison, celui-ci est plus important pendant la maturation des grains (figure 22). Mais cela ne semble pas affecter le rendement de la même manière que pendant les deux autres phases de développement. Le manque d'eau a plus de poids sur le rendement pendant la croissance végétative et la floraison que pendant la maturation des grains. En effet comme le montre le tableau 9, le rendement est beaucoup moins corrélé à la période de maturation des grains que pendant les deux autres phases de développement.

Semis précoce et choix du type variétal

En utilisant un modèle de culture pour simuler l'effet de la précocité sur le rendement, Meinke et al, (1993) en Australie n'ont pas montré d'avantage ou de désavantage clair pour un type variétal donné. Les auteurs ont montré que le type « tardif » était plus performant les années sans stress hydrique et le type « précoce » les années de sécheresse. Nous avons montré au contraire que le choix du type variétal, en rapport avec sa durée du cycle, jouait un rôle important dans la productivité de la culture. Le génotype tardif est celui qui présente les plus forts rendements quel que soit la date de semis. Mais lorsque la variété tardive est semée le 1^{er} février son rendement moyen pour les 25 années étudiées est de 36.5 q/ha soit plus 4 q/ha par rapport à une variété « moyenne » et plus 6 q/ha par rapport à une variété « précoce ». C'est donc la combinaison d'une variété à cycle long avec un semis avancé de deux mois qui garantit le potentiel de production le plus élevé. L'allongement de la phase de croissance végétative liée à la fois au semis précoce et au type variétal permet d'accumuler le maximum de biomasse. De plus, le type « tardif » est celui qui évite le mieux les stress hydriques avant la maturation des grains (figure 22). La représentation des interactions G X E dans le modèle SUNFLO constitue un avantage par rapport aux autres modèles de culture du tournesol puisqu'il permet de mettre en évidence l'idéotype le mieux adapté à une condition culturale donnée.

L'utilisation du modèle SUNFLO s'est avérée très utile pour évaluer *ex situ* les effets d'une pratique innovante comme le semis précoce sur un grand nombre de séquences climatiques. Il nous a donné la possibilité d'explorer plusieurs types variétaux. Ces simulations nous permettent de conclure que le semis précoce est une pratique qui permettrait d'éviter la majorité des stress hydriques survenant pendant la croissance végétative et la floraison et ainsi d'augmenter la production potentielle du tournesol. En associant le semis précoce avec une variété tardive, le rendement est encore amélioré. Cela confirme donc notre hypothèse initiale selon laquelle la pratique du semis précoce permettrait d'esquiver les sécheresses estivales qui ont des conséquences sévères sur la production du tournesol. De plus, le semis précoce permet de récolter tôt, entre fin Août et fin Septembre selon le type variétal, ce qui constitue un atout pour l'implantation en bonnes conditions d'une céréale d'automne.

Il faut cependant rester prudent et apporter quelques nuances à ces résultats. Certes, plus le semis est précoce et plus le rendement est élevé, mais plus on avance la date de semis, et plus on augmente le risque que la culture subisse des dégâts liés aux températures négatives. Il faut donc trouver une alternative en termes de gestion des risques, entre l'esquive de la sécheresse

et le risque de destruction des cultures par des températures trop basses. De plus nos simulations ont été réalisées dans des conditions de densité de 6 plantes/m², alors que dans la réalité, les densités observées lors des semis précoces pourraient être fortement réduites et irrégulières. Nous n'avons pas pris en compte ce facteur dans l'estimation du rendement par simulation. Dans ce cas, c'est l'action cumulée des basses températures et d'une pression de prédation supérieure (ravageurs) qui est à l'origine de la diminution de la densité. Enfin, le modèle ne prend pas en compte les effets d'éventuels pathogènes donc les conséquences sur le semis précoce peuvent être importantes. Par exemple, qu'en sera-t-il des attaques de phomopsis dans le cas d'un semis précoce présentant une forte couverture foliaire au moment de la libération des spores de Phomopsis en Mai ?

4.1.4 Conclusion

La qualité prédictive du modèle de culture SUNFLO dans des conditions de semis précoce associé à des basses températures en début de cycle est satisfaisante. En effet, l'erreur moyenne de prédiction du rendement en semis précoce est de 5 q/ha ; elle est donc incluse dans l'intervalle moyen des erreurs de prédiction du modèle (3 à 5,5q/ha). Son formalisme actuel n'est pas à remettre en question dans ces conditions de semis précoce, et on peut donc étendre son domaine de validité pour des semis de fin d'hiver (tant que la photopériode ne rentre pas en jeu dans le développement). Les simulations réalisées sur un grand nombre de séquences climatiques ont mis en évidence que le semis précoce permettait d'éviter les sécheresses estivales néfastes à la productivité, notamment pendant les phases de croissance végétative et de floraison. SUNFLO est donc un outil utile pour l'évaluation de pratiques innovantes, destinées à esquiver la sécheresse. De plus, grâce à sa capacité à représenter les interactions génotype x environnement, le modèle permet d'identifier l'idéotype le mieux adapté à la pratique du semis précoce. Dans notre cas d'étude, il s'agirait d'une variété à cycle long. SUNFLO permet donc d'évaluer de nouveaux 'phénotypes' en préalable à une sélection mieux ciblée.

Il ressort néanmoins de cette partie deux principaux points à approfondir : l'un concerne les améliorations qu'il faudrait apporter au modèle pour accroître sa qualité prédictive dans le cas de semis précoces (faibles densités, maladies). L'autre concerne l'exploration d'une base génétique plus large. Il apparaît important, au vu de nos résultats, d'augmenter la variabilité génétique à explorer dans le modèle afin d'identifier les idéotypes les mieux adaptés au semis précoce (faible température de base pour les paramètres de levée, forte capacité de croissance à basse température, longueur du cycle). C'est ce deuxième point qui fera l'objet de la partie suivante. Dans cette partie, nous étudierons à travers une population de 100 génotypes présentant une forte variabilité génétique : les paramètres liés à la levée à basse température (germination et croissance de l'hypocotyle), la capacité de croissance à basse température ainsi que la phénologie dans le cas du semis précoce.

4.2 Etude génétique des traits agro-morphologiques et physiologiques impliqués dans le fonctionnement de génotypes de tournesol soumis à des contraintes de basses températures en début de cycle

4.2.1 Introduction

La sélection de nouvelles variétés capables de s'adapter à des contraintes abiotiques fortes (chaleur, sécheresse, froid, salinité) représente l'une des clés dans la mise en œuvre de pratiques agricoles innovantes devant permettre de répondre aux enjeux d'une agriculture durable (Collins *et al.*, 2008).

L'amélioration variétale est basée sur la sélection de caractères d'intérêts, rendue possible grâce à la variabilité phénotypique exprimée pour ces caractères dans des conditions environnementales particulières. L'efficacité de la sélection dépend donc de la variabilité phénotypique du caractère que l'on veut améliorer mais également de son héritabilité et de sa réponse à la sélection (Falconer et Mackay, 1996). Or pour la majorité des caractères d'intérêts agronomiques la valeur phénotypique est sous la dépendance d'un grand nombre de gènes, de facteurs environnementaux et de l'interaction entre le génotype et l'environnement. Pour améliorer la performance d'un caractère dans un environnement donné ou pour créer un nouveau type variétale (en combinant des caractéristiques déjà existantes mais chez des variétés distinctes) il faut donc d'abord analyser le poids de chacune des composantes de la variance phénotypique (variances génétique, environnementale et l'interaction entre les deux) afin d'estimer les paramètres statistiques tels que l'héritabilité, les corrélations entre caractères ou le gain génétique (Falconer et Mackay, 1996).

Si ces concepts de génétique quantitative constituent les bases du progrès génétique, ils ne permettent cependant pas d'accéder aux informations liées au contrôle génétique comme le nombre, l'effet et la localisation des gènes intervenant dans l'expression d'un caractère. L'utilisation en sélection de marqueurs moléculaires et de cartes génétiques denses a rendu possible l'identification et la localisation des régions chromosomiques impliquées dans la variation de caractères quantitatifs, ou « QTLs » (Quantitative Trait Loci) (Dekkers et Hospital, 2002). La détection et l'analyse de ces QTLs permettent de maîtriser des phénomènes importants en sélection comme l'hétérosis et donne accès à des connaissances sur l'organisation et le fonctionnement du génome à travers l'étude de paramètres comme la dominance, l'épistasie ou la pléiotropie. Enfin, l'utilisation de marqueurs moléculaires

comme caractères associés à un phénotype permet d'améliorer l'efficacité de la sélection par le biais de la sélection assistée par marqueurs (Dekkers et Hospital, 2002).

L'existence d'une population de lignées recombinantes (Flores Berrios *et al.*, 2000) et d'une carte génétique dense chez le tournesol (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007a) a déjà permis l'étude de la résistance au Mildiou et au Phoma sur tige (Al Chaarani *et al.*, 2002) et l'analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol soumis à la sécheresse (Ebrahimi *et al.*, 2008; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007b). En effet, les maladies et la sécheresse sont les principaux facteurs limitant la productivité de la culture du tournesol. Le semis précoce, d'un à deux mois par rapport à la date habituelle dans la région, est envisagé comme stratégie d'esquive de la sécheresse. Cette nouvelle pratique induit une baisse significative de températures durant les premiers stades de développement de la culture, ce qui se répercute sur la croissance et le développement. La sélection de variétés nouvelles tolérantes aux basses températures et capable de valoriser au mieux cette pratique est donc nécessaire.

En se basant sur la population de lignées recombinantes cartographiée dans notre laboratoire, nous nous proposons d'étudier l'effet du semis précoce associé à des basses températures en début de cycle sur la croissance et le développement du tournesol. Nous chercherons ainsi à quantifier la variabilité génétique qui s'exprime pour des caractères agronomiques liés au développement (levée, floraison) et à la croissance (production de biomasse, LAI) soumis à des basses températures en début de cycle. Les caractères physiologiques impliqués dans la tolérance au froid seront également étudiés. La recherche de QTLs sera réalisée pour tous ces caractères agro-morphologiques et physiologiques dans des conditions de semis précoces associés à des basses températures.

D'abord les processus relatifs à la levée (germination et élongation de l'hypocotyle) seront étudiés à travers des modèles écophysiologiques permettant de caractériser la réponse des génotypes à la température. L'effet des basses températures sur l'ensemble du développement végétatif (du semis à la floraison) sera ensuite étudié en conditions de semis précoce à travers l'analyse de traits agronomiques comme le temps thermique nécessaire à la floraison, la surface foliaire et la biomasse à la floraison. Enfin, cinq traits physiologiques relatifs au fonctionnement des plantes à basses températures seront étudiés afin de mettre en évidence des indicateurs physiologiques faciles à mettre en œuvre pour évaluer la croissance et le développement du tournesol à basse température. Ces résultats ont fait l'objet de trois articles rédigés en anglais et sont présentés tels qu'ils ont été soumis ou publiés.

4.2.2 Présentation et résumés des articles

4.2.2.1 *Estimation des températures de base de germination et d'élongation de l'hypocotyle chez le tournesol*

Cet article a pour but de caractériser, par l'utilisation de modèles écophysiologiques, la réponse à la température des processus relatifs à la levée : germination et élongation de l'hypocotyle. Pour cela ces deux caractères ont été étudiés en conditions contrôlées chez une population de lignée recombinante. L'objectif initial était de déterminer les températures de bases de germination et de levée, mais cela n'a été possible que pour la vitesse d'élongation de l'hypocotyle. En effet, la réponse de la vitesse de germination à la température s'est révélée être non linéaire, ce qui n'a pas permis de déterminer une température de base de germination. Mais les paramètres de réponse de la germination aux basses températures ont malgré tout permis de révéler la variabilité génétique existante au sein de la population de LIRs étudiée et d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans la germination à basse température chez le tournesol. Cet article a été soumis à *Plant science* en septembre 2009.

Résumé

La pratique du semis précoce de tournesol conduit à ce que la phase de levée se déroule pendant des périodes de basses températures. La réponse des vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle aux basses températures ont été étudiées chez une population de 95 lignées recombinantes (LIRs) de tournesol dans le but d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans la variation de ces caractères à basses températures. Les vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle ont été mesurées à 3°C, 4.6°C, 7°C, 10°C et 15°C en conditions contrôlées. L'ajustement des vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle en fonction de la température a été réalisé pour chaque génotype de la population de LIRs et les paramètres des courbes ont été déterminés. La réponse de la vitesse de germination aux basses températures a été décrite par un modèle exponentiel alors que la réponse de la vitesse d'élongation de l'hypocotyle aux basses températures a été décrite par un modèle linéaire. Pour chaque génotype, quatre paramètres ont été déterminés : $b0_G$ et $b1_G$ qui représentent respectivement la vitesse potentielle de germination à 0°C et la réponse à la température, et $b1_El$ et TB_El qui correspondent respectivement la vitesse moyenne et la température de base d'élongation de l'hypocotyle. Plusieurs QTLs ont été identifiés pour

chacun des paramètres. Peu de QTLs présentant des effets forts ont été détectés pour les paramètres relatifs à la réponse de l'élongation de l'hypocotyle à basses températures. L'un d'entre eux est associé à un marqueur SSR et pourrait être utilisé dans le cadre de programmes de sélection assistée par marqueurs pour la sélection de variétés capables de lever rapidement à basses températures.

4.2.2.2 Phénologie et production de biomasse en conditions de semis précoces associées à des basses températures

Ce deuxième article s'intéresse aux effets des basses températures sur le développement végétatif (de la levée à la floraison) dans des conditions de semis précoces. Pour cela une population de LIR a été semée au champ dans deux localités aux conditions pédo-climatiques contrastées afin de tester la stabilité génétique des caractères étudiés notamment le temps thermique nécessaire à la floraison. Cette expérimentation devait également permettre d'étudier le déterminisme génétique des caractères agronomiques liés au rendement de la culture dans des conditions de semis précoces, mais une sécheresse trop sévère à partir de la floraison dans l'un des deux sites d'étude (en Algérie) a rendu inexploitable les résultats acquis après la floraison. Cet article a été soumis à *Plant Breeding* en juin 2009.

Résumé

La date de floraison, la biomasse aérienne et la surface foliaire à la floraison ont été mesurées au champ afin d'étudier le déterminisme génétique de ces caractères chez le tournesol dans des conditions de semis précoces associées à des basses températures. Une population de lignées recombinantes et leurs deux parents ont été semés à deux dates : une conventionnelle et une anticipée d'un mois dans deux localités contrastées, en France à Auzerville et en Algérie à Constantine. Les résultats montrent que la floraison est avancée dans le cas des semis précoces par rapport aux semis conventionnels en dépit des basses températures qui ont induit une augmentation de la durée de la phase végétative. Des QTLs spécifiques pour le temps thermique nécessaire pour atteindre la floraison dans le cas des semis précoces ont été détectés. La biomasse à la floraison a diminué avec l'avancée de la date de semis. Un seul QTL commun aux deux conditions de dates de semis a été identifié pour ce caractère. La production de biomasse est significativement corrélée à la durée de la phase végétative dans toutes les conditions de semis. Ces deux caractères sont liés génétiquement comme le montrent deux QTLs communs identifiés en condition de semis conventionnels. L'un de ces

deux QTLs est associé au marqueur SSR ORS243 qui pourrait être utilisé dans le cadre de sélection assistée par marqueur dans des programmes de sélection du tournesol.

4.2.2.3 Contrôle génétique de caractères physiologiques impliqués dans la tolérance au froid associé à la croissance à basses températures du tournesol dans des conditions de semis précoces

Ce troisième article ne s'intéresse pas à l'effet des basses températures sur la croissance ou le développement mais cherche à identifier des traits susceptibles d'être utilisés comme indicateurs de la croissance et du développement du tournesol à basses températures. Cette expérimentation a été menée au champ à Toulouse où une population de LIRs a été semée à trois dates de semis. Cinq traits physiologiques ainsi que la biomasse ont été mesurés à un stade précoce de développement. Cet article est publié : *Plant science* 177 (2009) 349–359.

Résumé

Cette étude a été réalisée dans le but d'identifier les traits physiologiques associés à la tolérance au froid chez le tournesol et d'identifier les régions génomiques impliquées dans la variation de ces caractères. Une population de 98 lignées recombinantes (LIRs) et leurs deux parents ont été semés au champ à différentes dates de semis : une conventionnelle (traitement contrôle) et deux précoces d'un et deux mois (traitement basse température sur du long terme). Des traits communément utilisés pour mettre en évidence les modifications physiologiques liés à la tolérance au froid, comme les dégâts des membranes ou la capacité de croissance (taux de chlorophylle, potentiel photochimique et biomasse aérienne), mais également liés aux mécanismes d'acclimatation au stress, comme le potentiel osmotique à pleine turgescence et la surface foliaire spécifique ont été mesurés à un stade précoce de développement. Des différences significatives ont été observées entre les différentes conditions de semis pour tous les traits. Le taux de chlorophylle et la surface foliaire spécifique sont des traits génétiquement associés à la tolérance au froid. Il existe un gain génétique significatif pour les taux de chlorophylle et le potentiel osmotique dans les conditions de semis précoce ce qui suggère que ces traits peuvent être utilisés dans des programmes de sélections pour la tolérance au froid chez le tournesol. L'analyse QTL montre que plusieurs régions génomiques sont potentiellement impliquées dans la variation des traits physiologiques étudiés à basse température. Les QTLs majeurs pour la tolérance au froid, associés à des marqueurs moléculaires SSR, comme par exemple le marqueur OR331_2 pour

la stabilité des membranes, doivent être validés dans plusieurs conditions environnementales avant de pouvoir être utilisés dans des programmes de sélections assistée par marqueurs.

4.2.3 QTL mapping for germination and seedling growth under low temperature in sunflower

Clémentine Allinne^a, Pierre Maury^a, Jean-Pierre Kalala^a, Philippe Grieu^{a,1}, Ahmad Sarrafi^{b,1,*}

^aUniversité de Toulouse; INPT; UMR AGIR; ENSAT, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France.

^bUniversité de Toulouse; INPT ; IFR40, Laboratoire SP2 ; ENSAT, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France.

¹ PhD supervisors

*Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Symbiose et Pathologie des Plantes

SP2, IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France. Tel.: +33 5 62 19 35 80; Fax: +33 5 62 19 35 80

E-mail address: sarrafi@ensat.fr

Abstract:

Early sowing in sunflower leads to low temperatures during seed germination in the field. In our study responses of germination and hypocotyl elongation rates to low temperatures are studied in a population of 95 RILs and their two parents and the genomic regions involved in these responses are identified. Rates of germination and hypocotyl elongation for each RIL and their parents were measured at 3°C, 4.6°C, 7°C, 10°C and 15°C under controlled conditions. Response curves of germination and hypocotyl elongation rates to low temperatures were performed for each RIL. Exponential and linear curves were used to describe the response of germination and hypocotyl elongation rates respectively. Four parameters for each genotype were determined which are the potential rate of germination at 0°C (b0-G), the germination response to temperature (b1-G), the rate of hypocotyl elongation (b1-El) and the base temperature of hypocotyl elongation (TB-El). Several QTLs were identified for each parameter. Response of rate of hypocotyl elongation to low temperature show few QTLs with strong effects and one of them is associated with an SSR marker and could be used in marker assisted selection for improving the emergence of sunflower at low temperature.

Key words: Sunflower, germination, hypocotyl elongation, QTL, low temperature

Introduction

Sunflower is a summer crop often subjected to water stress, which could reduce substantially the yield. Early sowing is one of the crop managements strategy to escape the drought mainly during flowering [1]. In temperate regions, sunflower is commonly sown when the mean temperature reaches about 15°C. Sowing one or two months earlier may lead to place the seeds in conditions of low temperatures of about 5 to 10°C. The period from sowing to emergence is a crucial step for stand establishment of this species. Consequently, selection of genotypes with a rapid and efficient emergence at low temperature is required for early sowing.

Ecophysiological models are designed to identify the effect of environmental conditions on physiological processes. The period from sowing to emergence can be described in two distinct temperature-dependant physiological processes: germination and hypocotyl elongation. Model equations and parameter values to predict rates of field emergence have been developed by combining sub-models for each physiological process [2,3]. The relationships between germination rate and temperature are mostly described by linear functions [4,5]. A nonlinear model have been also proposed by Yin *et al.* [6]. The rate of hypocotyl elongation is also described as a linear function of temperature [7,8]. Combination of temperature and time (*i.e* thermal time requirement expressed in degree-days) is a more appropriate unit of measure for predicting plant development than the time alone [9]. A basic requirement for this approach is an estimate of the temperature below which phenological development ceases, called as the base temperature [5]. Hardegree *et al.* [10] reported that error in prediction of germination time is exacerbated in low temperatures and could result in very large errors in prediction of field emergence in early spring. A model based on the rates of germination and hypocotyl elongation should be performed at low temperatures in order to improve selection of sunflower genotypes for early sowing at low temperature.

Significant genetic variability has been observed in a population of recombinant inbred line (RILs) of sunflower for germination and seedling development under optimal conditions by Al-Chaarani *et al.* [11]. This research work has also shown that several putative genomic regions with moderate effects are involved for germination in sunflower. The genetic analysis of germination under low temperature in tomato has revealed that additivity was the major genetic component [12]. In common bean, genetic control for germination at low temperatures has also shown a predominant additive genetic effect [13]. QTL models predict the contribution of alleles to quantitative traits under a limited number of environments

whereas ecophysiological models predict quantitative traits of one genotype in any environment [14]. Both approaches have been combined by Reymond *et al.* [15] to analyze the genetic variability of responses of maize leaf growth in different temperatures and water deficit levels, and QTLs for leaf elongation rate are identified. The same authors have demonstrated that identification of QTL for parameters of response curves provides a promising alternative for dealing with the genetic variability of adaptive traits.

As far as we know no study in the literature refers to the genetic analysis of the rates of germination and hypocotyl elongation in response to low temperature in sunflower. In the present work responses of germination rate and hypocotyl elongation to low temperature are studied in 95 RILs and their two parents and genomic regions controlling these parameters are identified.

Materials and methods

Plant material and experimental conditions

A population of 95 recombinant inbred lines (RILs) was developed through single-seed descent from a cross between PAC2 and RHA266 [16]. The RIL population and their two parents were used in order to determine the genetic variability for germination rate and hypocotyl elongation responses to low temperatures. The effect of temperature on germination rate and hypocotyl elongation was assessed in five experiments conducted in a refrigerated incubators at 3°C, 4.6°C, 7°C, 10°C and 15°C. Each experiment consisted of 24 seeds per genotype. Seeds were surface-sterilized with 0.5% calcium hypochloride and washed three times in sterile, distilled water and briefly blotted. Then four seeds were placed on a 90mm diameter petri dish on two filter papers moistened with 3 ml of sterile, distilled water. Six petri dishes per genotype were sealed with Parafilm to prevent the seeds from drying out and small amounts of water were added when needed.

For each temperature, germination was observed every 24h. Date of germination for each genotype was determined when 50% of seeds showed penetration of the structures surrounding the embryo by the radical as described by Bewley [17]. Duration of germination (DG) was determined as the number of days from the date of sowing to the date of germination. The rate of germination (RG) was calculated as the inverse of duration of germination (1/DG). Two measurements of hypocotyl length were taken for each temperature condition. Dates of measurements were determined from thermal time in degree day (°Cd) at

90°Cd and 120°Cd. Rate of hypocotyl elongation (RHE) in mm/day was calculated as the difference of hypocotyle length at 120°Cd and 90°Cd divided by the number of days between 120°Cd and 90°Cd .

Statistical analyses

Regressions were performed for each RIL to determine the responses of the rates of germination and hypocotyl elongation as a function of the temperature (θ). The curve estimation program of SPSS for Windows software (15.0) was used to evaluate alternative regression formulae for goodness-of-fit based on maximization of the coefficient of determination (R^2). Linear (1) and exponential (2) models were tested for both physiological processes (germination and hypocotyl elongation). The standard error of the two parameters b_0 and b_1 was given by the curve estimation procedure for both models.

$$rate = b_0 + b_1 \times \theta \quad (1)$$

$$rate = b_0 \times e^{b_1 \times \theta} \quad (2)$$

The regression coefficients of the linear model (1) can then be related to the base temperature T_b as the x-intercept [18]:

$$T_b = \frac{-b_0}{b_1} \quad (3)$$

The standard error of T_b (SE_{T_b}) was calculated from the estimated variance of T_b (V_{T_b}) as [19]:

$$SE_{T_b} = \sqrt{\frac{V_{T_b}}{n}} \quad (4)$$

With

$$V_{T_b} \approx \left(\frac{\bar{b}_0}{\bar{b}_1} \right)^2 \times \left[\frac{V_{b_0}}{\bar{b}_0^2} + \frac{V_{b_1}}{\bar{b}_1^2} \right] - \frac{2 \text{cov}(b_0, b_1)}{\bar{b}_0 \times \bar{b}_1} \quad (5)$$

Where \bar{b}_0 and \bar{b}_1 are the mean of b_0 and b_1 respectively, and V is the variance of b_0 or b_1 whereas $\text{cov}(b_0, b_1)$ is the covariance of b_0 and b_1 .

Means of genotypes for each parameter were compared by computing the *a priori* pair wise comparisons using the Tukey's honestly significant differences (HSD) test [20,21]. Genetic gain for the studied parameters is calculated as the differences between the mean of the top

10% selected RILs and the mean of the two parental lines. Differences are compared with the HSD test.

Sunflower reference map recently constructed by Poormohammad Kiani *et al.* [22] was used for detection of QTLs. This map contains 304 AFLP and 191 SSR markers, with a mean density of one locus every 3.7cM. We used composite interval mapping method [23] to estimate the QTL locations and effects with QTL Cartographer version 2.5 software [24]. The control marker number and the window size were 15 and 15cM, respectively. A QTL was considered significant if the LOD score exceeded 3.0 [25]. Mapchart 2.1 was used for graphical presentation of linkage groups and map position of the SSR and AFLP markers.

Results

The responses of the germination rate (A) and the hypocotyl elongation (B) to temperature for contrasted genotypes among the population of 95 recombinants inbred lines and their parents are presented in Fig.1. Results show that exponential model is better than linear model to describe the relationship between germination rate and temperatures. The coefficient of determination values (R^2) for the 95 exponential adjustments ranged from 95.2% to 99.4%. Linear model was efficient to describe the relationship between hypocotyl elongation and temperature. The coefficient of determination values (R^2) for the 95 linear adjustments ranged from 62.3% to 94.6%.

Two parameters, b_0 and b_1 were calculated for each genotype with two regression models. Parameters for the exponential model of the germination rate in relation to temperatures which are the potential rate of germination at 0°C (b_0 -G) and the response of germination rate to temperature (b_1 -G) are resumed Table 1. B_0 -G ranged from 0.024 days⁻¹ to 0.031 days⁻¹ depending on genotype whereas b_1 -G is ranged from 0.141 °C⁻¹ to 0.169°C⁻¹. Parameters for the linear model of hypocotyl elongation in relation to temperatures are the rate of hypocotyl elongation (b_1 -El), ranging from 0.104 mm/°Cd to 0.391 mm/°Cd, and the base temperature for the hypocotyl elongation (TB -El), corresponding to the temperature below which no elongation will occur, ranging from 0.41°C to 4.42°C (Table 1).

Most of the genetic variability is expressed for hypocotyl elongation parameters. The mean rate of hypocotyl elongation present a significant genetic gain when the mean of the two parents is compared with the mean of the 10% selected RILs (Table1).

Several putative genomic regions are involved in the expression of the parameters related to the response of germination and hypocotyl elongation rates to low temperatures. The map position and the characteristics of QTLs associated with the studied parameters are presented in Table 2 and in Fig.2. Two to eight QTLs are identified depending on the studied parameters. QTLs explain from 6% to 40% of the phenotypic variance of the traits (R^2). Additive effects present positive or negative values showing that both parental lines contribute to the expression of the different traits. The largest amount of phenotypic variance (40%) is explained by a QTL detected for the base temperature of hypocotyl elongation (*TB-El-14.1*).

Two major QTLs are detected for the potential rate of germination at 0°C (*b0-G*) on linkage groups 4 (*b0-G -4.1*) and 14 (*b0-G -14.1*) which explain 23% and 22% of the phenotypic variance respectively. The QTL for *b0-G* on the linkage group 4 is co-located with a major QTL detected for the germination response to temperature (*b1-G*), which explains 22% of the phenotypic variance. Two major QTLs detected for the parameters related to hypocotyl elongation (*b0-El-14.1* and *TB-El-14.1*) are located on linkage group 14 and are associated with the SSR marker *ORS1128*. These two QTLs explain respectively 23% and 40% of the phenotypic variance of *b0-El* and *TB-El*.

Three common QTLs for *b0-G* and *b1-G* are collocated on linkage group 1 (*b0-G -1.1* and *b1-G -1.1*), 4 (*b0-G -4.1* and *b1-G -4.1*) and 16 (*b0-G -16.1* and *b1-G -16.1*). Two QTLs for *b0-El* and *TB-El* are collocated on linkage group 14 (*b1-El -14.1* and *TB-El -14.1*) and 16 (*b1-El -16.1* and *TB-El -16.1*). Collocated QTLs are also detected for *b0-G* and *b1-El* on linkage group 5 (*b0-G -5.1* and *b1-El -5.1*). These two collocated QTLs explain 8% of the phenotypic variance for *b0-G* and 13% of the phenotypic variance for *b1-El*.

Discussion

Our results revealed a non-linear relationship for the response of the rate of germination to low temperature in sunflower and an exponential model was used giving a better representation of the relationship, whereas linear model was used for the rate of hypocotyl elongation. Correlation between rate of early plant development (defined as the inverse of duration for the process to occur) and temperatures is commonly represented by a linear model [26]. Linear model was used to determine the base temperature of germination in wheat [27], pasture species [4], *Lesquerella* species [28], and the base temperature of

hypocotyl elongation in soybean [7], onion [8], wheat [27]. Consistent deviations from linear model are also reported for the rate of germination response to low temperature [28,29,18]. Hardegree *et al.* [10] suggested that non linear models may be more accurate in predicting germination-time, especially at low temperatures where small errors in predicted rate can result in relatively large errors in time of germination. A nonlinear model for crop development as a function of temperature is proposed by Yin *et al.* [6] through the use of *Beta* function which include the base of temperature and the optimal temperature among estimated parameters.

In our study we used an exponential model to describe the germination rate response to low temperature in order to obtain a valuable estimation of the coefficient determination even if it does not allow determining the base temperature of the germination rate. The b0-G parameter is defined as a potential rate of germination at zero degree and ranged from 0.024 days⁻¹ to 0.031 days⁻¹. The base temperatures of zero degree for germination were observed in several temperate pasture species [4]. In wheat the base temperature for germination was 0.4°C [27]. More recently, Brunel *et al.* have shown that the base temperatures for different genotypes of *Medicago truncatula* ranged from 0.9°C to 3.0°C [31].

Our results show that the genetic variability was important for the rate of hypocotyl elongation. Particularly, for the base temperature (TB-El) which is ranged from 0.4°C to 4.4°C and presents highly significant differences between RILs (Table 1). The mean of the b1-El parameter among the RIL population studied is 0.22 mm/°Cd.

Angus *et al.* [18] determined the base temperature and the thermal time requirement for emergence in sunflower respectively at 7.9°C and 66.9 °Cd in the field conditions, showing that sunflower has low capacity of emergence at low temperature. On the contrary, our results show that sunflower has the potential to germinate and to grow at temperatures close to 3 degree. Selection for tolerant genotypes to low temperatures for emergence considering the base temperature and the rate of hypocotyl elongation is more important than germination alone.

Differences between the means of the RILs and the mean of their parents are not significant for b0-G, b1-G and b1-El parameters (Table 1). This indicates that the RILs are representative of possible genotypic combinations of the two parents for the studied traits, as it was also previously reported for the same RIL population for others traits [22]. Genetic gain was

significant only for the rate of hypocotyl elongation (b1-El). This might be due to positive transgressive segregation resulting from the accumulation of favorable alleles coming from both parents in some RILs. Transgressive segregation has already been observed for drought and cold adaptive traits in the same RIL population [30,31,32]. QTLs identified in the present study showed that several putative genomic regions were involved in the expression of the response parameters of the rates of germination and hypocotyl elongation to low temperatures (Table 2). The positive and negative signs of additive effect at the different loci indicate the genetic contribution of both parental lines. This confirms the transgressive segregation observed at phenotypic level excepted for the base temperature of hypocotyle elongation.

Three genomic regions of interest were found for the parameters related to germination where QTLs for b0-G and b1-G are collocated on linkage group 1 (*b0-G-1.1* and *b1-G-1.1*), linkage group 4 (*b0-G-4.1* and *b1-G-4.1*) and linkage group 16 (*b0-G-16.1* and *b1-G-16.1*). One of them is a major QTL for b0-G and b1-G explaining respectively 23% and 22% of the phenotypic variance (R^2) (Table 2). The genomic region of interest located in linkage group 16 presents overlapping QTLs associated with the SSR marker *ORS407* which can be interesting for marker assisted selection. These three genomic regions present the same particularity: two overlapping QTLs of each linkage group have opposite sign of additivity. It means that the parent, which gives favorable alleles for b0-G, does not give the favorable allele for b1-G. Negative signs of additivity were observed for the three QTLs detected for b0-G (*b0-G-1.1*, *b0-G-4.1* and *b0-G-16.1*) indicating that the favorable alleles come from the male parent (RHA266). Positive signs of additivity were observed for the three QTLs detected for b1-G (*b1-G-1.1*, *b1-G-4.1* and *b1-G-16.1*) and the favorable alleles come from the female parent (PAC2). RHA266 is the parent with the best potential rate of germination at zero degree (highest b0-G) and PAC2 have the best response of germination rate to temperature (highest b1-G). Consequently, these three genomic regions present a large interest for selecting genotypes with high capacity to germinate at low temperature associated with high capacity of response to temperature.

A major QTL was found for TB-El (*TB-El-14.1*) explaining 40% of the phenotypic variance. This QTL was collocated with a major QTL (*b1-El-14.1*) detected for b1-El which explain 23% of the phenotypic variance. These two overlapping QTLs constitute a genomic region of interest in relation with the rate of hypocotyl elongation. Moreover, both QTLs were associated with the SSR marker *ORS1128* which can be used as a tool for marker assisted selection programs.

A QTL detected in the linkage group 4 (*b1-G-4.3*) for germination response to temperature (*b1-G*) in our study is also collocated with a QTL detected the osmotic potential at full turgor during vegetative period [22]. This suggests that the rate of germination and the osmotic potential are two traits genetically associated. In linkage group 1 the QTL *b0-G-1.1* is collocated with two QTLs detected for osmotic potential under water stress [22] and under low temperature [31]. In linkage group 13 the QTL *b1-G-13.1* is collocated with a QTL indentified for the osmotic potential under low temperatures [31]. This suggests that germination under low temperature have a genetic control correlated with the genetic control of the osmotic potential under water stress and cold stress.

We can resume that in sunflower, germination rate at low temperature is an exponential function of temperature whereas the rate of hypocotyl elongation is linear. Sunflower presents a high genetic variability for germination and hypocotyl elongation at low temperatures. The genetic variability is expressed mainly for the rate of hypocotyl elongation–Selection for genotypes tolerant to low temperature during emergence phase may be realize *via* marker assisted selection using SSR marker *ORS1128* which is associated with a major QTL (*TB-El-14.1*) identified for the base temperature of hypocotyl elongation.

Acknowledgements

The authors thank Shirin Bahramdaryabeigi for technical assistance.

References

- [1] M.A. Soriano, F. Orgaz, F. J. Villalobos, E. Fereres, Efficiency of water use of early plantings of sunflower, *Eur. J. Agron.* 21 (2004) 465-476.
- [2] W.M. Blacklow, Influence of temperature on germination and elongation of the radicle and shoot of corn (*Zea mays L.*), *Crop Sci.* 12 (1972) 647-650.

- [3] D.F. Wanjura, D. R. Buxton, H. N. Stapleton, A temperature model for predicting initial cotton emergence, *Agron.J.* 62 (1970) 741-743.
- [4] D.J. Moot, W. R. Scott, A. M. Roy, A. C. Nicholls, Base temperature and thermal time requirements for germination and emergence of temperate pasture species, *N. Z. J. Agric. Res.* 43 (2000) 15-52.
- [5] S.J. Steinmaus, T. S. Prather, J. S. Holt, Estimation of base temperatures for nine weed species, *J.Exp.Bot.* 51 (2000) 275-286.
- [6] X. Yin, M. J. Kropff, G. McLaren, R. M. Vispera, A nonlinear model for crop development as a function of temperature, *Agric. For. Meteorol.* 77 (1995) 1-16.
- [7] J.L. Hatfield and D. B. Egli, Effect of temperature on the rate of soybean hypocotyl elongation and field emergence, *Crop Sci.* 14 (1974) 423-426.
- [8] T.R. Wheeler and R. H. Ellis, Seed quality, cotyledon elongation at suboptimal temperatures, and the yield of onion, *Seed Sci. Res.* 1 (1991) 57-67.
- [9] J.T. Ritchie and D. S. N. Smith, Temperature and crop development, In J.Hanks and J.T.Ritchie (ed.) *Modelling plant and soil systems.Agron.Monogr.31.ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.* (1991) 5-29.
- [10] S.P. Hardegree, Predicting germination response to temperature. I. Cardinal-temperature models and subpopulation-specific regression, *Ann Bot* 97 (2006) 1115-1125.
- [11] G.R. Al Chaarani, L. Gentzbittel, M. Wedzony, A. Sarrafi, Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Plant Sci.* 169 (2005) 221-227.
- [12] M.R. Foolad and G. Y. Lin, Genetic analysis of low-temperature tolerance during germination in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Plant Breed.* 117 (1998) 171-176.
- [13] S.T. Otubo, M. A. Patto Ramalho, A. d. F. Barbosa Abreu, J. B. dos Santos, Genetic control of low temperature tolerance in germination of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Euphytica* 89 (1996) 313-317.
- [14] M. Reymond, B. Muller, A. Leonardi, A. Charcosset, F. Tardieu, Combining Quantitative Trait Loci Analysis and an Ecophysiological Model to Analyze the Genetic Variability of the Responses of Maize Leaf Growth to Temperature and Water Deficit, *Plant Physiol.* 131 (2003) 664-675.

- [15] M. Reymond, B. Muller, F. Tardieu, Dealing with the genotypexenvironment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters, *J.Exp.Bot.* 55 (2004) 2461-2472.
- [16] L. Gentzbittel, F. Vear, Y. X. Zhang, A. Bervillé, P. Nicolas, Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus L.*), *Theor. Appl. Genet.* 90 (1995) 1079-1086.
- [17] J.D. Bewley, Seed germination and dormancy, *Plant Cell* 9 (1997) 1055-1066.
- [18] J.F. Angus, R. B. Cunningham, M. W. Moncur, D. H. Mackenzie, Phasic development in field crops I. Thermal response in the seedling phase, *Field Crop Res.* 3 (1980) 365-378.
- [19] A.M. Mood, F. M. Graybill, D. C. Boes, Introduction to the theory of statistics, McGraw-Hill Companies 3rd Edition (1974)
- [20] P. Casadebaig, P. Debaeke, J. Lecoecur, Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes, *Eur. J. Agron.* 28 (2008) 646-654.
- [21] P. Dagnelie, Statistique théorique et appliquée, Tome 2: Inférence statistique à une et deux dimation, De Boeck et Larcier s.a., Département De Boeck université, Paris, Bruxelles (1998)
- [22] S. Poormohammad Kiani, P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, A. Sarrafi, Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments, *Plant Sci.* 172 (2007) 773-787.
- [23] Z.B. Zeng, Precision Mapping of Quantitative Trait Loci, *Genetics* 136 (1994) 1457-1468.
- [24] C. Basten, B. Weir, Z. Zeng, QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina StateUniversity.USA, (2007) p. 185.-
- [25] G.R. Al Chaarani, L. Gentzbittel, X. Q. Huang, A. Sarrafi, Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus L.*), *Theor. Appl. Genet.* 109 (2004) 1353-1360.
- [26] D.A. Charles-Edwards, D. Doley, G. M. Rimmington, Modelling plant growth and development, Academic press Australia (1986) 155-171.

- [27] P.C. Addae, C. J. Pearson, Thermal requirement for germination and seedling growth of wheat, *Aust. J. Agric. Res.* 43 (1990) 585-594.
- [28] N.R. Adam, D. A. Dierig, T. A. Coffelt, M. J. Wintermeyer, B. E. Mackey, G. W. Wall, Cardinal temperatures for germination and early growth of two *Lesquerella* species, *Ind. Crop. Prod.* 25 (2007) 24-33.
- [29] B. Marshall, G. R. Squire, Non-linearity in rate-temperature relations of germination in oilseed rape, *J. Exp. Bot.* 47 (1996) 1369-1375.
- [30] S. Poormohammad Kiani, P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel, A. Sarrafi, Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus L.*), *Theor. Appl. Genet.* 114 (2007) 193-207.
- [31] C. Allinne, P. Maury, A. Sarrafi, P. Grieu, Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions, *Plant Sci.* 177 (2009) 349-359.
- [32] A. Ebrahimi, P. Maury, M. Berger, S. Poormohammad Kiani, A. Nabipour, P. Grieu, A. Sarrafi, QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes, *Genome* 51 (2008) 599-615.

Table 1

Genetic variability and genetic gain for the parameters of response of the rates of germination and hypocotyl elongation to low temperatures in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents.

	Potential rate of germination at 0°C (1/days)	Germination response to temperature (1/°C)	Rate of hypocotyl elongation (mm/°Cd)	Base temperature of hypocotyl elongation (°C)
PAC2 (P1)	0.023	0.169	0.204	2.55
RHA266 (P2)	0.027	0.150	0.126	0.67
P1-P2	-0.004 ^{NS}	0.019 ^{NS}	0.078 ^{NS}	1.87 ^{***}
\bar{X}_P	0.025	0.160	0.165	1.61
\bar{X}_{RIL}	0.027	0.155	0.217	2.82
RIL min	0.024	0.141	0.104	0.41
RIL max	0.031	0.169	0.391	4.42
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	0.002 ^{NS}	-0.005 ^{NS}	0.052 ^{NS}	1.21 ^{**}
$\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$	0.030	0.165	0.362	1.15
GG10%= $\bar{X}_{10\% \text{ Best RIL}} - \bar{X}_P$	0.005 ^{NS}	0.005 ^{NS}	0.197 ^{***}	-0.46 ^{NS}

'PAC2' (P1) and 'RHA266' (P2): parental lines; \bar{X}_P : mean of two parental lines; \bar{X}_{RIL} : mean of recombinant inbred lines (RILs); $\bar{X}_{10\% \text{ Best RIL}}$: the mean of the top 10% selected RILs; GG10% : genetic gain when the mean of the top 10% selected RILs is compared with the mean of the parents.

*, **, ***, Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level. NS, non significant

Table 2

Map position and effect of QTLs for potential rate of germination at 0°C (b0-G), germination response to temperature (b1-G), rate of hypocotyl elongation (b1-EI) and base temperature of hypocotyl elongation (TB-EI) detected in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs).

Trait	QTL	Linkage group	Nearest marker	Position cM ^(a)	LOD score	R ² ^(b)	Additive effect
Potential rate of germination at 0°C (1/days)	<i>b0-G -1.1</i>	1	<i>E33M48_2</i>	29.3	6.8	0.11	-0.0005
	<i>b0-G -4.1</i>	4	<i>E33M60_8</i>	11.3	11.6	0.23	-0.0007
	<i>b0-G -4.2</i>	4	<i>E40M59_12</i>	27.6	6.0	0.15	-0.0006
	<i>b0-G -5.1</i>	5	<i>E35M60_1</i>	25.6	4.4	0.08	0.0005
	<i>b0-G -9.1</i>	9	<i>HA477</i>	42.8	3.2	0.06	-0.0003
	<i>b0-G -9.2</i>	9	<i>E32M47_8</i>	116.1	4.4	0.07	0.0004
	<i>b0-G -14.1</i>	14	<i>E41M62_26</i>	138.2	4.2	0.22	0.0007
	<i>b0-G -16.1</i>	16	<i>ORS407</i>	145.6	7.0	0.15	-0.0006
Germination response to temperature (1/°C)	<i>b1-G -1.1</i>	1	<i>E33M48_2</i>	29.3	6.2	0.10	0.0019
	<i>b1-G -4.1</i>	4	<i>E33M60_8</i>	13.3	10.7	0.22	0.003
	<i>b1-G -4.2</i>	4	<i>E35M62_12</i>	20.5	6.5	0.14	0.0024
	<i>b1-G -4.3</i>	4	<i>E35M62_1</i>	67.8	5.1	0.15	-0.0024
	<i>b1-G -10.1</i>	10	<i>ORS889</i>	8.9	5.2	0.10	0.0021
	<i>b1-G -13.1</i>	13	<i>ORS316</i>	68.7	4.8	0.13	-0.0023
	<i>b1-G -16.1</i>	16	<i>ORS407</i>	143.6	7.8	0.15	0.0024
	<i>b1-G -17.1</i>	17	<i>ORS31_3</i>	0.0	6.4	0.11	-0.0021
Rate of hypocotyl elongation (mm/°Cd)	<i>b1-EI -5.1</i>	5	<i>E35M60_1</i>	23.6	3.6	0.14	-0.0261
	<i>b1-EI -14.1</i>	14	<i>ORS1128</i>	2.0	4.8	0.23	0.0344
	<i>b1-EI -16.1</i>	16	<i>E37M47_5</i>	84.8	3.8	0.12	-0.0272
Base temperature of hypocotyl elongation (°C)	<i>TB-EI -14.1</i>	14	<i>ORS1128</i>	2.0	8.3	0.40	0.6061
	<i>TB-EI -16.1</i>	16	<i>E37M61_8</i>	82.8	4.1	0.15	-0.4099

^(a) From the north of linkage group.

^(b) Percentage of individual phenotypic variance explained.

Fig. 1: Responses of the rates of germination (A) and hypocotyl elongation (B) to low temperature for contrasted genotypes among a population of 95 recombinants inbred lines and their two parents.

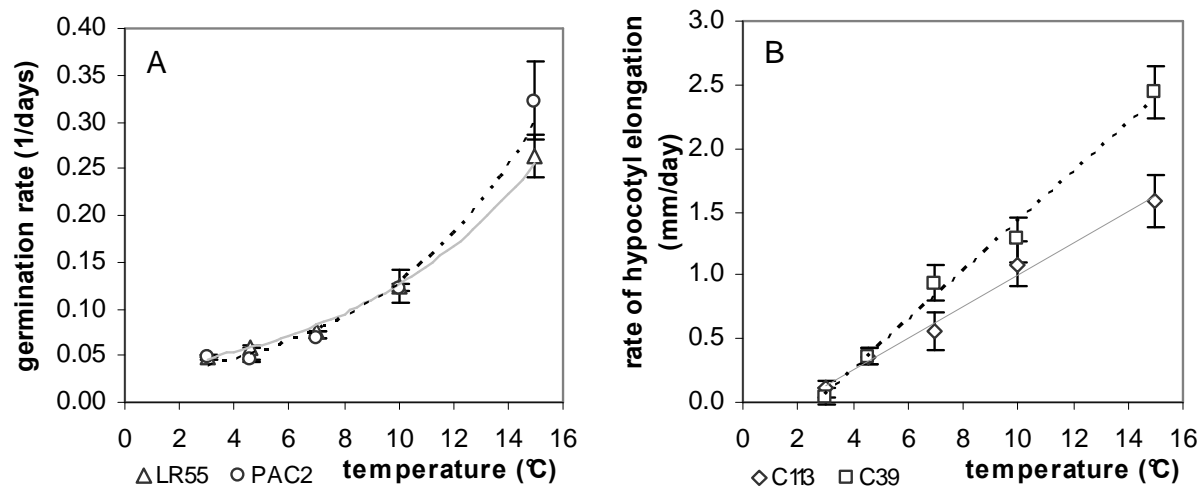


Fig.2: Sunflower genetic map presenting QTL associated with the potential rate of germination at 0°C (b0-G), the germination response to temperature (b1-G), the mean rate of hypocotyl elongation (b1-El) and the base temperature of hypocotyl elongation (TB-El). The positions of the QTLs are represented on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs.

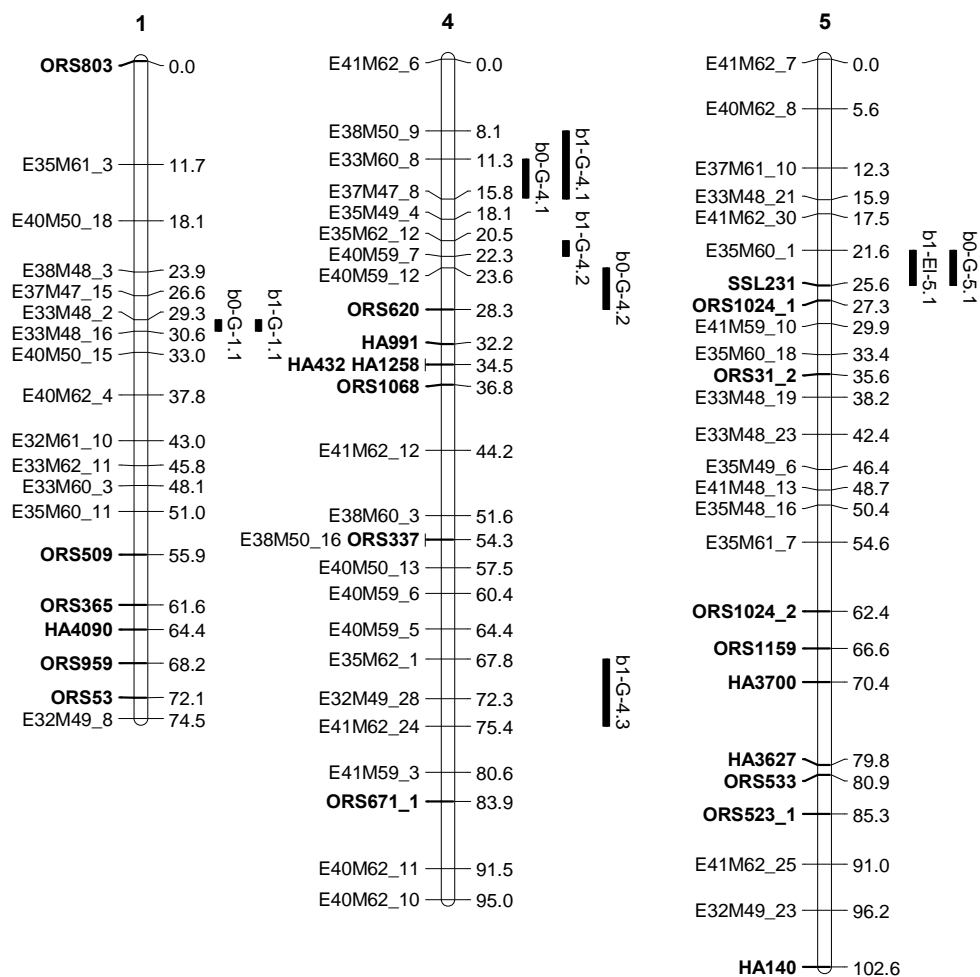


Fig.2 (continued)

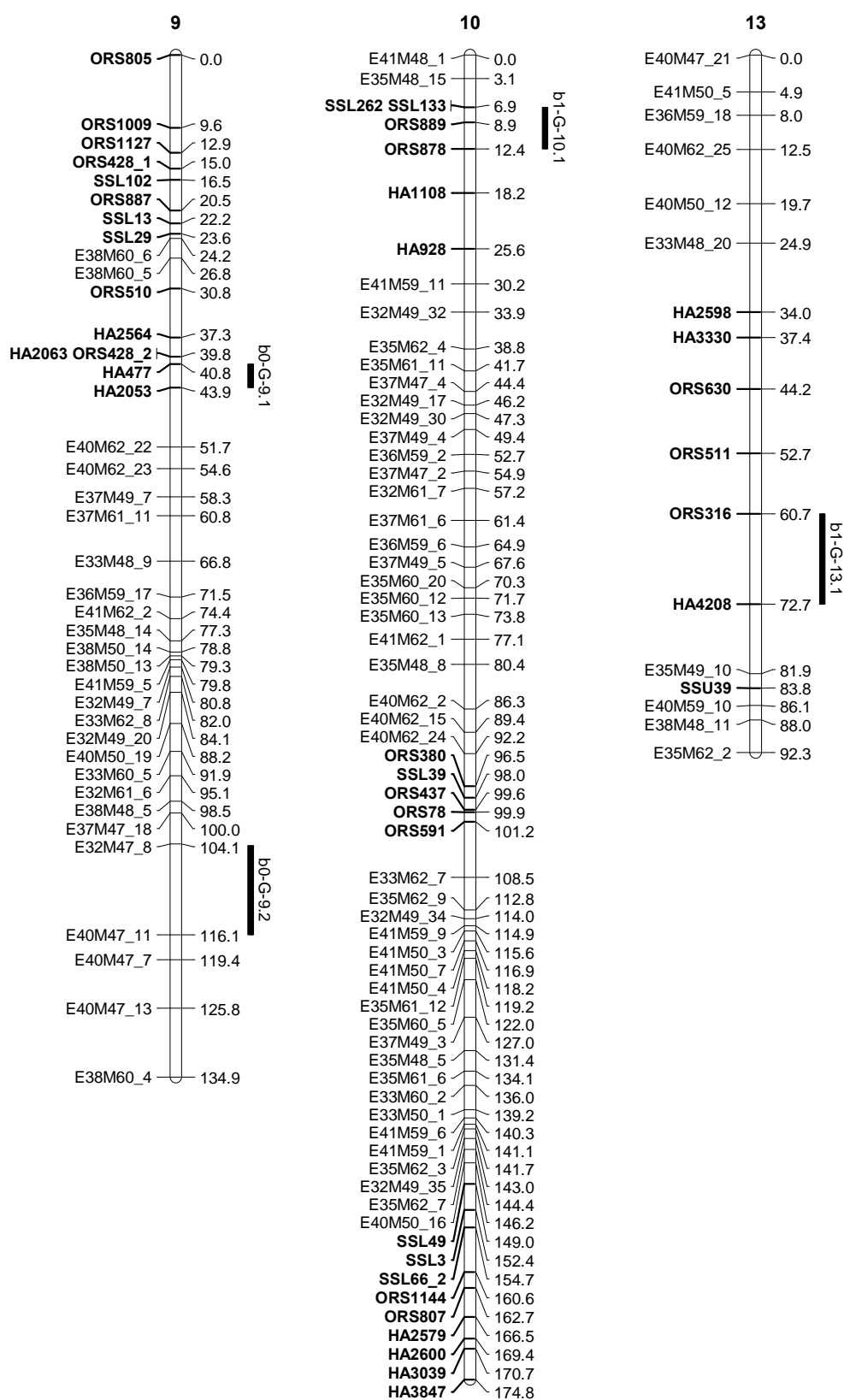
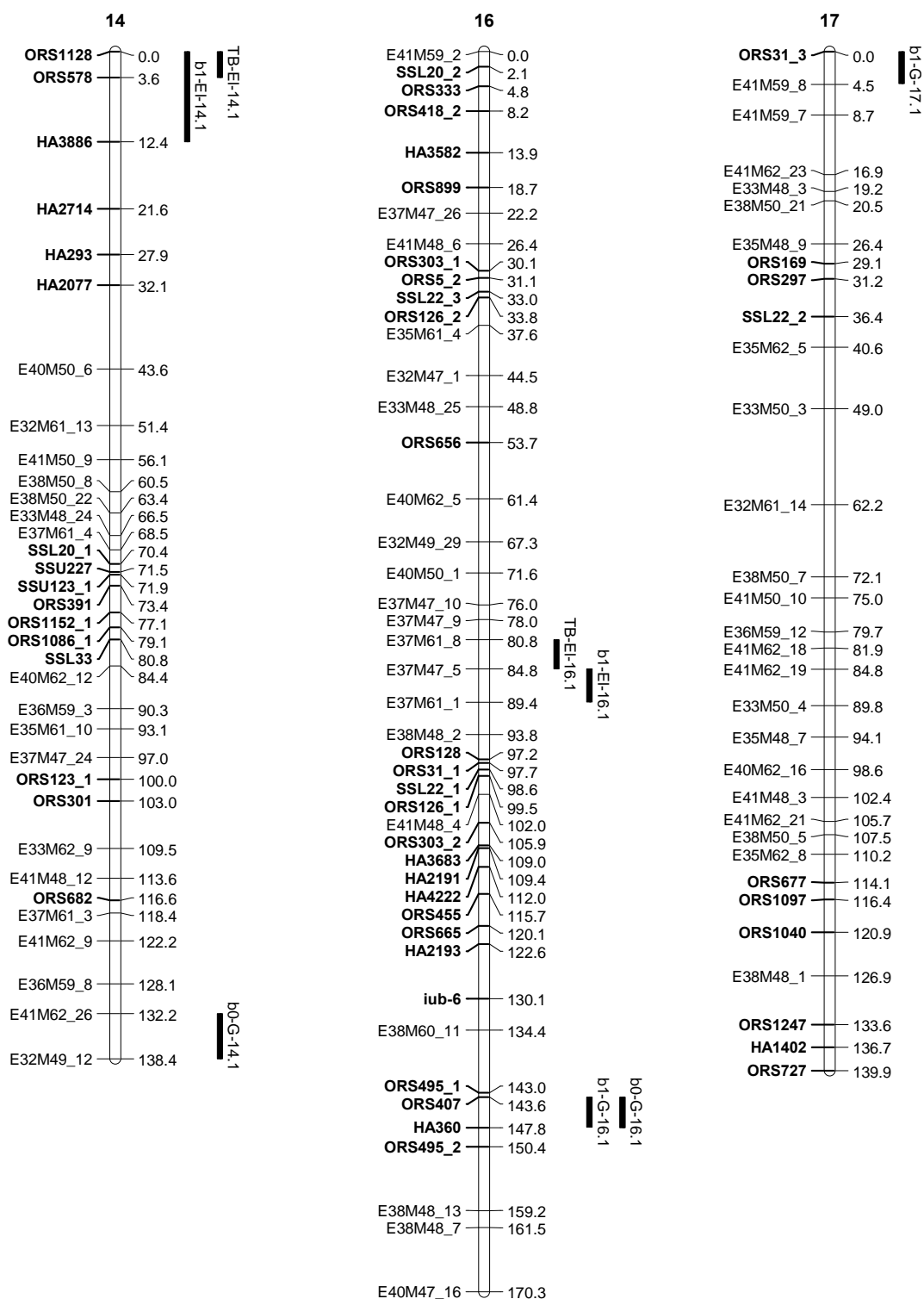


Fig.2 (continued)



4.2.4 QTL mapping of phenology and vegetative growth traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under early sowing associated with low temperature conditions.

Allinne C.¹, Maury P.¹, Ghoribi N.³, Djekoun A.³, Ykhlef N.³, Grieu P.^{1*}, Sarrafi A.^{2*}

¹Université de Toulouse; INPT; UMR AGIR; ENSAT, 31320 CASTANET TOLOSAN, France.

²Université de Toulouse; INPT ; IFR 40, Laboratoire SP2 ; ENSAT, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France.

³Université de Mentouri ; Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes, 25000 CONSTANTINE, Algeria.

* PhD supervisors

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Symbiose et Pathologie des Plantes

SP2, IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607,

31326 Castanet Tolosan,

France

E-mail: sarrafi@ensat.fr

Abstract

Flowering time, plant dry weight and leaf area at flowering were determined in the field conditions to study the genetic determinism of these traits under early sowing associated with low temperatures in sunflower. A population of recombinant inbred lines and their two parents were sown at traditional date and one month-earlier in two contrasted locations, in France and in Algeria. Results show that flowering was earlier compared with normal sowing even though low temperatures occurring under early sowing increases the duration of vegetative growth. Specific QTLs for growing degree-days from sowing to flowering in early sowing were detected. Plant dry weight at flowering was reduced in early sowing. A single common QTL was identified between the two sowing dates for this trait. The correlation between vegetative period and biomass accumulation was significant under both sowing dates. These two traits were genetically linked with two common QTLs identified under traditional sowing. One of them is collocated with the SSR marker *ORS243* and could be used for marker-assisted selection in sunflower breeding programs.

Key words: early sowing - *Helianthus annuus* L. - low temperatures - sunflower- QTL.

Introduction

Sunflower is a summer crop often subjected to water stress, which reduces yield, especially when drought takes place during flowering and seed development. These two periods are crucial to obtain a high yield because water deficits during these periods reduce the supply of assimilates for reproductive growth (Barros et al. 2004) . Two main strategies are considered to increase sunflower productivity of non-irrigated cropping systems. The first strategy consists in selecting genotypes tolerant to dehydration during the water deficit conditions (Pereyra-Irujo et al. 2007). The second one is to sow earlier in order to avoid the occurrence of drought at the time of flowering. Early sowings of sunflower including winter planting are tested in several Mediterranean countries. Under early sowing conditions, water availability was increased (Barros et al. 2004, Soriano et al. 2004) as well as the yield (Anastasi et al. 2000, Gimeno et al. 1985, Hadjichristodoulou 1987). However, a major disadvantage of early sowing in temperate regions is that vegetative growth will occur at low temperature. Genetic analysis of cold tolerance was performed for early growth in maize (Brandolini et al. 2000, Hund et al. 2004), sorghum (Knoll et al. 2008) and rice (Baruah et al. 2009). To our knowledge, no study in sunflower refers to the influence of low temperature throughout the vegetative growth. In sunflower, the number of days from sowing to flowering, corresponding to the vegetative growth period, is a major consideration in breeding programs because the maximum yield of the crop can only be achieved if cultivars have a high vegetative growth in their environment (Leon et al. 2000). It is necessary to identify genotypes for early flowering associated with high vegetative growth efficiency under low temperature conditions. Genetic mapping for days from sowing to flowering in sunflower has been reported by many studies under optimal conditions and showed that flowering is controlled by few QTLs with major effects (Bert et al. 2004, Leon et al. 2001, Mokrani et al. 2002). Detection of QTL for growing degree days determined from sowing to flowering was also performed in six environments known to elicit a photoperiod response between the inbred lines (Leon et al. 2001). Days from sowing to flowering was also studied in sunflower under water stress conditions (Poormohammad Kiani et al. 2009). As far as we know, genetic analysis of growth related traits during vegetative period under low temperature due to early sowing is not reported in sunflower.

The objective of this research was to investigate the genetic determinism of leaf area, plant dry weight and flowering time in recombinant inbred lines at traditional sowing date and one month-earlier sowing in two contrasted locations, in France and in Algeria.

Materials and Methods

Plant material and experimental conditions

A population of 98 sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their parents RHA266 and PAC2 (Poormohammad Kiani et al. 2007) were used in our experiments. Field experiments were realized in two contrasted pedoclimatic locations; in France (INRA Auzeville station, Toulouse: 43°31'46,94" N; 1°29'59,71" E) and in Algeria (CNCS El-Khroub station, Constantine: 36°16'17.65"N; 6°40'13.01"E). In Toulouse, the soil composition was clay loam (clay 35%) with a low content of organic matter (1.5%) about two meters deep, whereas in Constantine the limestone soil was shallow and likely subjected to water deficit in dry conditions. Over the past ten years, in the French and Algerian sites the temperature was usually low in spring (traditional sowing time). There are more rainfalls in summer in France when compared with the Algerian site. Daily maximum and minimum temperatures and rainfall were recorded at each location and additional information was obtained from Meteo-France. In Algeria, the early sowing was performed at 3 March and the second sowing at 26 March corresponding to the traditional sowing period. In France, the early sowing was realized at March 14th and the second sowing at April 19th which represents traditional sowing date at Midi-Pyrenees region. The mean temperature of the early sowings from sowing to flowering, for the two locations was three degree lower than the mean temperature of the traditional sowing. The mean temperature was 14°C in early sowing versus 17°C in traditional sowing in Algeria, and 15°C in early sowing versus 18°C in traditional sowing in France. The thermal amplitude was higher in Algeria than in France as shown in Fig. 1, with lower minimal mean temperatures and higher maximal mean temperature. The cumulative rainfall from sowing to flowering was 242 mm in the traditional sowing in France, 106 mm in the traditional sowing in Algeria, 276 mm in the early sowing in France and 213 mm in the early sowing in Algeria. The cumulative rainfall is higher in France than in Algeria for the two sowing dates and substantially lower in traditional than in early sowing in Algeria.

Two experiments were undertaken in each location with early and traditional sowing dates. The experimental design was complete randomized blocs with three replications including 98 RILs and their parents. Each genotype per replication consisted of two rows, 3m long, with 50cm between rows and 25cm between plants in row, giving a total number of about 24 plants per plot. Days from sowing to flowering were recorded when 50% of the plants per experimental unit were at anthesis (Schneiter and Miller 1981). The cumulative growing degree days (GDD) in °Cd were calculated as the sum of the average daily temperature minus

base temperature of 4.8°C (Granier and Tardieu 1998). Total plant leaf area at flowering (LAF) was calculated according to the formula presented by Pouzet and Bugat(2004):

$$LAF = \frac{1}{2}(L \times W \times 0.746 \times LN) + (LN \times 30), \text{ where } LN \text{ is the number of leaf per plants, } L \text{ is}$$

the length of the largest leaf and W the width of the largest leaf measured at flowering stage. After measurements, plants were sampled and dried (during 48 hours at 80°C). Shoot dry weight at flowering (DWF) corresponding to the total dry matter accumulation during vegetative growth was measured

Statistical analysis and QTL mapping

Normality of the different traits was assessed according to the Shapiro and Wilk test (Dagnelie 1998). Logarithmic transformation was done for LAF and DWF in order to obtain a normal distribution. Analysis of variance was realized to determine the effects of; location, sowing date, genotype and their interactions for the studied traits. Correlations were estimated between all variables using simple Pearson correlation coefficient. Analyses were performed with SPSS (11.0.1) for Window. Genetic gain for each trait was calculated as the differences between the mean of the top 10% selected RILs and the mean of the parents.

QTL mapping of the studied traits was performed using composite interval mapping (CIM) conducted with QTL Cartographer version 2.5 software (Basten et al. 2007) using mean values of the three replicates for each RIL in each condition. The genome was scanned at 2 cM intervals with a window size of 15 cM. Up to 15 background markers were used as cofactors in the CIM analysis identified with the standard model (model 6). A QTL was considered significant if the LOD score exceeded 3.0 (Al Chaarani et al. 2004). Mapchart 2.1 was used for graphical presentation of linkage groups and map position of the SSR and AFLP markers.

Results

Phenotypic variation and effect of early sowing

Early sowing in the two locations induced early flowering in time, even if early sowing conditions increase the duration of vegetative growth (Fig. 1). The number of days from sowing to flowering is higher in early sowing than in traditional sowing in the two locations

with respectively in France and in Algeria 19 days and 12 days more. In France, early sowing was realized 37 days before the traditional sowing date and flowering occurred only 18 days before flowering of traditional one, whereas in Algeria early sowing was 23 days before the traditional sowing and flowering occurred 11 days before it (data not presented).

Analysis of variance of the 98 recombinant inbred lines and their two parents (PAC2 and RHA266) showed highly significant genotype and sowing date effects for all the traits studied (Table 1). The location effect was significant for the leaf area at flowering (LAF) and for plant dry weight at flowering (DWF) but not significant for the growing degree-days from sowing to flowering (GDDF). “Genotype x location” interaction was significant only for GDDF (Table 1).

Phenotypic performance of RILs and their parents for the three measured traits under the two sowing dates in two locations are presented in Table 2. Differences between the mean of the two parents was not significant for the studied traits, except for DWF in France in traditional sowing and for LAF in Algeria in early sowing. The difference between the mean of the RILs and the mean of parents was significant only for GDDF in France. Dry weight at flowering (DWF) decreased in early sowing conditions in both locations and LAF decreased in France and increased in Algeria under early sowing compared to traditional sowing (Table 2).

Genetic gain, presented as the difference between the mean of 10% selected RILs and the mean of the parents was significant for LAF and DWF in Algeria and in France under traditional sowing date (Table 2). Phenotypic correlations between the measured traits under the two sowing dates in both locations are presented in Table 3. High significant correlation between DWF and LAF was observed under all sowing dates and locations. DWF and GDDF show also significant correlation for all sowing dates in both locations. Correlation between LAF and GDDF was significant only in the traditional sowing date in France and in early sowing in Algeria.

QTLs mapping

The map position and characteristics of QTLs associated with the measured traits under the two sowing dates in two locations are presented in Table 4. QTLs are designated as follows: ‘GDDF’ for growing degree days from sowing to flowering, ‘LAF’ for leaf area at flowering and ‘DWF’ for plant dry weight at flowering, followed by ‘TS’ or ‘ES’ for traditional sowing and early sowing, then by ‘A’ or ‘F’ for Algeria and France locations, and finally by

corresponding linkage group and the number of QTLs in the group. For an easier overview of overlapping QTLs an image of all QTL regions is presented in Fig. 2. Several putative genomic regions are involved in the expression of the studied traits in each growing conditions. Three to nine QTLs were found depending on each trait, sowing date and location. These QTLs explain from 7% to 26% of the phenotypic variance of the trait (R^2). QTLs with strong effects are detected for DWF on linkage group 8 in traditional sowing in France (*DWF-TS-F.8.2* and *DWF-TS-F.8.3*). A QTL identified for LAF under early sowing in France (*LAF-ES-F.7.1*) is also a major one with a LOD score of 9.2 and a R^2 of 24.1%.

Four genomic regions were identified where overlapping QTLs were found for the GDDF trait (Table 4 and Fig. 2). On linkage groups 2 and 3, QTLs identified for GDDF in Algeria under both sowing condition were co-located (*GDDF-TS-A.2.1* and *GDDF-ES-A.2.1* on linkage group 2 and *GDDF-TS-A.3.1* and *GDDF-ES-A.3.1* on linkage group 3). On linkage group 17, overlapping QTLs were detected for GDDF under traditional sowing in France (*GDDF-TS-F.17.1*) and in Algeria (*GDDF-TS-A.17.1*). These two QTLs were associated with the SSR marker *ORS1040* (figure 2). Another genomic region was found on linkage group 14 where the QTLs identified for GDDF in France and in Algeria under early sowing were co-located (*GDDF-ES-F.14.1* and *GDDF-ES-A.14.2*) (Fig. 2).

. QTLs for DWF (*DWF-ES-A.8.1*) and LAF (*LAF-ES-A.8.1*) in early sowing in Algeria are co-located on linkage group 8 (Fig. 2). Under traditional sowing in France the QTL *DWF-TS-F.8.3* which is a major QTL (explaining 25 % of the genetic variability with a LOD score of 9.6) is co-located with the QTL *LAF-TS-F.8.1*, detected for LAF associated with the SSR marker *ORS243* and with a QTL for GDDF (*GDDF-TS-F.8.2*).

The sign of additive effect for all of common QTLs for GDDF in different conditions is positive. This indicates that the majority of the alleles having positive effect for these QTLs come from the female parent “PAC2” (Table 4). On the contrary, the three overlapped QTLs identified for LAF, DWF and GDDF on linkage group 8 present negative signs of additive effects and alleles having positive effect for theses QTLs come from the male parent (RHA266).

Discussion

Low temperatures were observed mainly in the first month of the growth during development of the plants in early sowings in the two locations (Fig. 1). Early flowering in time is observed

under early sowing compared with flowering under traditional sowing in spite of the effect of low temperatures, which induces slower growth in early sowing. Cumulative growing degree-days from sowing to flowering (GDDF) is affected by sowing date (Table 2). Common QTLs between several conditions were identified for GDDF on linkage groups 2, 3, 14 and 17. All these common QTLs present positive additive sign (Table 4), which shows that the majority of the alleles having positive effect come from “PAC2”. The two overlapped QTLs; *GDDF-TS-F.17.1* and *GDDF-TS-A.17.1* in our research are also co-located with two QTLs detected for the days from sowing to flowering (*DSFI.17.1* and *DSFD.17.1*) under well-watered and water-stressed conditions (Poormohammad Kiani et al. 2009), which indicates that this genomic region located on the linkage group 17 should be involved in flowering in sunflower. Moreover, the overlapped QTLs on this genomic region are associated with an SSR marker (*ORS1040*), which could be used, in marker-assisted selection breeding programs. Table 2 shows that DWF, in early sowing which is associated with low temperature, is lower than in traditional sowing in both locations. DWF is reduced even if the number of days from sowing to flowering was increased with early sowing. Previous works in sunflower have shown that early sowing leads to an increase of the biomass accumulation associated with an increase of the accumulated intercepted radiation (de la Vega and Hall 2002). It was also shown that the biomass production and the leaf area from winter sowing was twice than those of spring sowing in south areas of Spain (Gimeno et al. 1989). In these two studies, minimum temperature was never below 4°C whereas in our study minimum temperature was frequently close to 0°C (Fig. 1). The reduction of the biomass accumulation observed in early sowing in our study should be explained by the reduction of the photosynthetic performance at low temperature during the first stages of growth in early sowing. Six QTLs were identified for DWF on the linkage group 8 and one of them (*DWF-TS-F.8.2*) is co-located with the QTL (*BIOL.8*) identified for the same trait at harvest by (Poormohammad Kiani et al. 2009). The common QTL (*DWF-TS-F.8.2*) associated with an SSR marker *ORS243* is the most important one for the trait explaining 26.5% of the total variance. Two other QTLs (*BION.7.2* and *BIOL.7.1*), detected by Poormohammad Kiani et al. (2009), are overlapped with two QTLs for DWF on linkage group 7 (*DWF-TS-F.7.1* and *DWF-ES-F.7.1*) and 16 (*DWF-ES-F.16.1* in our experiment. The common QTLs between the two studies have the same negative sign of additive effects indicating that these genomic regions come from the male parent “RHA266”. An important genomic region on linkage group 7 is detected where five QTLs overlapped which are for LAF and DWF in early (*LAF-ES-F.7.1*, *DWF-ES-F.7.1*) and traditional (*LAF-TS-F.7.1*, *DWF-TS-F.7.1*) sowing in France and for GDDF (*GDDF-TS-F.7.1*) only in

traditional sowing in France. A total of eleven QTLs of Poormohammad Kiani et al. (2009) for; days from sowing to flowering, number of leaf per plant, leaf area at flowering, leaf area duration, plant height and total dry matter, overlapped with the five above mentioned QTLs in our study. Consequently, the genomic region between 17 and 25 cM in linkage group 7 in sunflower is interesting for enhance biomass and leaf area at flowering in optimal condition and in abiotic stress conditions as drought or low temperature. Two genomic regions were also found on linkage group 8 where QTLs for DWF (*DWF-TS-F.8.3*) and GDDF (*GDDF-TS-F.8.2*) overlapped, under traditional sowing condition in France (Fig. 2). In Algeria early sowing leaded to twice more rainfall during vegetative growth than traditional sowing (Fig. 1). The mean temperature at flowering in early sowing was ranged between 20°C and 25°C whereas in traditional sowing the mean temperature ranged between 30°C and 35°C. In traditional sowing conditions, the high mean temperature associated with low rainfall during vegetative growth in Algeria, induced a drought stress more intense than that, which occurred in early sowing conditions. In this way, early sowing can be an alternative way to escape drought especially at flowering when sunflower is particularly sensitive to dehydration. In Algeria, water shortage for traditional sowing compared to the early sowing during the vegetative period had probably as consequence a decrease of plant leaf area at flowering (Table 2). The most important QTL for DWF in traditional sowing in Algeria (*DWF-TS-A-2.1*), located on the linkage group 2 explained 21% of the total phenotypic variance for the trait. This QTL is overlapped with the QTL, OA.2.1 identified for the osmotic adjustment in water stress condition by Poormohammad Kiani et al. (2007). The opposite sign of additive effects for these two overlapped QTLs show that the parent, which presents favorable alleles for DWF, is PAC2 and the one with favorable alleles for osmotic adjustment is RHA266.

As conclusion, early sowing associated with low temperature leads to early flowering in time and may escape water stress, which can occur at flowering in traditional sowing. In early sowing which is associated with low temperatures in each location, specific QTLs for GDDF are identified. Selecting genotypes with low values for GDDF under low temperatures could reduce the number of days from sowing to flowering in early sowing. Vegetative growth under early sowing was affected by low temperatures and induced a reduction of the biomass accumulation. To increase the biomass accumulation we must enhance the cold tolerance in sunflower. Specific QTLs for the biomass accumulation in early sowing associated with SSR markers could supply tools for breeding programs.

Acknowledgements

The authors thank Mr. Michel Labarrère for his technical assistance in France and the ITGC station (Institut Technique des Grandes Cultures) in Algeria.

References

- Al Chaarani, G. R., L. Gentzbittel, X. Q. Huang, and A. Sarrafi, 2004: Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus L.*). Theor. Appl. Genet. **109**, 1353-1360.
- Anastasi, U., M. Cammarata, and V. Abbate, 2000: Yield potential and oil quality of sunflower (oleic and standard) grown between autumn and summer. Ital.J.Agron. **4**, 23-36.
- Barros, J. F. C., M. de Carvalho, and G. Basch, 2004: Response of sunflower (*Helianthus annuus L.*) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. Eur. J. Agron.**21**, 347-356.
- Baruah, A., N. Ishigo-Oka, M. Adachi, Y. Oguma, Y. Tokizono, K. Onishi, and Y. Sano, 2009: Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. Euphytica **165**, 459-470.
- Basten, C., B. Weir, and Z. Zeng, 2007: QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. North Carolina StateUniversity.USA,
- Bert, P. F., G. Dechamp-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D. T. de Labrouhe, P. Nicolas, and F. Vear, 2004: Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Theor. Appl. Genet. **109**, 865-874.
- Brandolini, A., P. Landi, G. Monfredini, and F. Tano, 2000: Variation among Andean races of maize for cold tolerance during heterotrophic and early autotrophic growth. Euphytica **111**, 33-41.
- Dagnelie, P., 1998: Statistique théorique et appliquée, Tome 2: Inférence statistique à une et deux dimensions. De Boeck et Larcier S.A., Département De Boeck université, Paris, Bruxelles
- de la Vega, A. J. and A. J. Hall, 2002: Effects of planting date, genotype, and their interactions on sunflower Yield: II. Components of oil yield. Crop Sci. **42**, 1202-1210.

- Gimeno, V., J. Fernandez-Martinez, and E. Fereres, 1985: Sunflower response to winter plantings in a mediterranean environment. *Helia* **8**, 63-67.
- Gimeno, V., J. Fernandez-Martinez, and E. Fereres, 1989: Winter planting as a means of drought escape in sunflower. *Field Crop Res.* **22**, 307-316.
- Granier, C. and F. Tardieu, 1998: Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? *Plant, Cell & Environment* **21**, 695-703.
- Hadjichristodoulou, A., 1987: Trials with winter-sown sunflower. *Helia* **10**, 57-61.
- Hund, A., Y. Fracheboud, A. Soldati, E. Frascaroli, S. Salvi, and P. Stamp, 2004: QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 618-629.
- Knoll, J., N. Gunaratna, and G. Ejeta, 2008: QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum. *Theor. Appl. Genet.* **116**, 577-587.
- Leon, A. J., F. H. Andrade, and M. Lee, 2000: Genetic mapping of factors affecting quantitative variation for flowering in sunflower. *Crop Sci.* **40**, 404-407.
- Leon, A. J., M. Lee, and F. H. Andrade, 2001: Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in Sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theor. Appl. Genet.* **102**, 497-503.
- Mokrani, L., L. Gentzbittel, F. Azanza, L. Fitamant, R. G. Al Chaarani, and A. Sarrafi, 2002: Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theor. Appl. Genet.* **106**, 149-156.
- Pereyra-Irujo, G. A., L. Velázquez, C. Granier, and L. A. N. Aguirrezábal, 2007: A method for drought tolerance screening in sunflower. *Plant Breeding.* **126**, 445-448.
- Pilorgé, E., G. Arjaure, and C. Adam, 2004: guide de l'expérimentateur tournesol. CETIOM, ed.
- Poormohammad Kiani, S., P. Maury, N. Ykhlef, L. Nouri, P. Grieu, and A. Sarrafi, 2009: QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding. In press*
- Poormohammad Kiani, S., P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, and A. Sarrafi, 2007: Genetic analysis

of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172**, 773-787.

Pouzet, A. and F. Bugat, 1985: Description d'une méthode simple et rapide pour l'estimation de la surface foliaire par plante chez le tournesol. In: *Proceedings of the 11th International Sunflower Conference*.ISA, Mar del Plata, Argentina 21-26.

Schneider, A. A. and J. F. Miller, 1981: Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**, 901-903.

Soriano, M. A., F. Orgaz, F. J. Villalobos, and E. Fereres, 2004: Efficiency of water use of early plantings of sunflower. *Eur. J. Agron.* **21**, 465-476.

Table 1: Analysis of variance (mean squares) for cumulative growing degree-days from sowing to flowering (GDDF, in °Cd), plant dry weight at flowering (DWF, in g) and leaf area at flowering (LAF, in cm²) in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown in two locations (France and Algeria) under traditional sowing and early sowing conditions.

source of variation	d.f	LAF	DWF	GDDF
Location	1	129.858 ***	31.227 ***	4429.210
Sowing date	1	0.372 ***	1.942 ***	2775834.445 ***
Genotype (RIL)	99	0.057 ***	0.102 ***	26504.066 ***
Genotype x Location	99	0.017 ns	0.034 ns	8393.468 ***
Genotype x Sowing date	99	0.011 ns	0.032 ns	4453.171 ns
Error	98	0.015	0.027	4132.216

*, **, ***, Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level. ns, non significant

Table 2: Genetic gain for the cumulative growing degree-days from sowing to flowering (GDDF), plant dry weight at flowering (DWF) and leaf area at flowering (LAF) in two locations (France and Algeria) under traditional sowing and early sowing conditions.

trait		FRANCE		ALGERIA	
		traditional sowing	early sowing	traditional sowing	early sowing
LAF	PAC2 (P1)	3443	3334	550	853
	RHA266 (P2)	3210	2529	653	517
	P1-P2	233 ns	805 ns	-103 ns	337 *
	\bar{X}_P	3326	2932	601	685
	\bar{X}_{RIL}	3590	2745	645	705
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	264 ns	-187 ns	43 ns	20 ns
	$\bar{X}_{10\% SRIL}$	5269	3923	848	996
	GG10% = $\bar{X}_{10\% SRIL} - \bar{X}_P$	1943 *	991 ns	246 *	311 *
DWF	PAC2 (P1)	60.7	68.8	21.5	52.7
	RHA266 (P2)	48.2	31.5	18.7	-
	P1-P2	12.5 ns	37.4 **	2.9 ns	-
	\bar{X}_P	54.5	50.2	20.1	-
	\bar{X}_{RIL}	59.3	46.1	24.8	22.4
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	4.9 ns	-4.1 ns	4.7 ns	-
	$\bar{X}_{10\% SRIL}$	89.7	72.3	39.7	46.5
	GG10% = $\bar{X}_{10\% SRIL} - \bar{X}_P$	35.2 *	22.2 ns	19.6 ***	-
GDDF	PAC2 (P1)	996	1002	1081	992
	RHA266 (P2)	1015	988	1067	860
	P1-P2	-19 ns	15 ns	14 ns	132 ns
	\bar{X}_P	1005	995	1074	926
	\bar{X}_{RIL}	1081	1044	1138	981
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	76 **	49 **	64 ns	55 ns
	$\bar{X}_{10\% SRIL}$	995	981	1024	880
	GG10% = $\bar{X}_{10\% SRIL} - \bar{X}_P$	-10 ns	-14 ns	-50 ns	-47 ns

Significant differences are presented as bold-face. 'PAC2' (P1) and 'RHA266' (P2): parental lines; \bar{X}_P : mean of two parental lines; \bar{X}_{RIL} : mean of recombinant inbred lines (RILs); $\bar{X}_{10\% SRIL}$: the mean of top 10% of selected RILs; GG10%: genetic gain when the mean of the top 10% selected RILs is compared with the mean of the parents.

LAF: leaf area at flowering (cm²); DWF: plant dry weight at flowering (g); GDDF: cumulative growing degree days from sowing to flowering (°Cd).

*, **, ***, Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level. ns, non significant

Table 3 : Phenotypic correlation (Pearson coefficients) between cumulative growing degree days from sowing to flowering (GDDF), plant dry weigh at flowering (DWF) and leaf area at flowering (LAF) in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown in two locations (France and Algeria) under traditional sowing and early sowing conditions.

	Trait	traditional sowing		early sowing	
		LAF	DWF	LAF	DWF
<u>FRANCE</u>	DWF	0.88 ***		0.85 ***	
	GDDF	0.53 ***	0.46 ***	0.15 ns	0.39 ***
<u>ALGERIA</u>	DWF	0.47 ***		0.62 ***	
	GDDF	0.13 ns	0.24 *	0.29 **	0.34 ***

*, **, ***, Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level. ns, non significant

Table 4: Map position and the effect of QTLs for leaf area at flowering (LAF), plant dry weigh at flowering (DWF), and cumulative growing degree days from sowing to flowering (GDDF) , detected in RILs in two locations (France and Algeria) under traditional sowing and early sowing conditions.

traditional sowing							early sowing						
	QTL	LG	position cM ^(a)	LOD	R ² ^(b)	additive effect		QTL	LG	position cM ^(a)	LOD	R ² ^(b)	additive effect
LAF													
FRANCE	LAF-TS-F.3.1	3	6.9	4.0	0.07	-281.6		LAF-ES-F.5.1	5	29.9	5.1	0.10	246.1
	LAF-TS-F.6.1	6	0.0	3.7	0.08	-287.5		LAF-ES-F.7.1	7	21.6	9.2	0.24	-331.7
	LAF-TS-F.7.1	7	21.6	5.8	0.12	-380.1		LAF-ES-F.14.1	14	77.1	4.2	0.09	-228.0
	LAF-TS-F.8.1	8	61.3	7.6	0.19	-423.8		LAF-ES-F.16.1	16	59.7	8.8	0.22	-319.8
	LAF-TS-F.9.1	9	42.8	6.7	0.17	-442.7							
ALGERIA	LAF-TS-A.2.1	2	12.9	3.8	0.09	-40.2		LAF-ES-A.2.1	2	31.5	3.9	0.09	-63.1
	LAF-TS-A.2.2	2	18.8	7.9	0.17	-56.8		LAF-ES-A.4.1	4	2.0	4.8	0.10	52.3
	LAF-TS-A.4.1	4	11.3	4.5	0.09	38.4		LAF-ES-A.8.1	8	31.2	10.1	0.20	-82.0
	LAF-TS-A.8.1	8	7.0	3.8	0.08	-35.7		LAF-ES-A.10.1	10	160.6	6.8	0.13	-63.7
	LAF-TS-A.10.1	10	43.7	4.7	0.16	-49.4							
	LAF-TS-A.10.2	10	52.7	8.1	0.18	-55.3							
	LAF-TS-A.15.1	15	5.7	4.1	0.08	36.3							
DWF													
FRANCE	DWF-TS-F.5.1	5	48.7	4.3	0.09	5.4		DWF-ES-F.7.1	7	20.1	5.9	0.11	-5.6
	DWF-TS-F.7.1	7	20.7	8.3	0.14	-7.5		DWF-ES-F.12.1	12	0.0	9.1	0.18	6.6
	DWF-TS-F.8.1	8	42.2	7.2	0.19	-8.3		DWF-ES-F.14.1	14	11.6	6.1	0.15	-6.1
	DWF-TS-F.8.2	8	59.3	12.7	0.26	-9.4		DWF-ES-F.16.1	16	161.2	4.0	0.07	-3.8
	DWF-TS-F.8.3	8	67.4	9.6	0.25	-9.0							
	DWF-TS-F.9.1	9	11.6	3.9	0.08	6.1							
ALGERIA	DWF-TS-A.1.1	1	55.9	5.9	0.07	1.8		DWF-ES-A.8.1	8	22.0	4.4	0.08	3.5
	DWF-TS-A.2.1	2	57.3	13.6	0.21	3.1		DWF-ES-A.8.2	8	31.2	6.4	0.12	-3.3
	DWF-TS-A.13.1	13	60.7	6.2	0.08	-2.1		DWF-ES-A.8.3	8	38.2	6.7	0.14	-5.0
							DWF-ES-A.12.1	12	23.9	7.3	0.10	-3.4	
							DWF-ES-A.12.2	12	90.0	14.7	0.24	5.1	
							DWF-ES-A.17.1	17	0.0	5.8	0.08	-2.8	
GDDF													
FRANCE	GDDF-TS-F.2.1	2	94.6	5.4	0.09	19.7		GDDF-ES-F.1.1	1	64.4	6.8	0.09	-14.2
	GDDF-TS-F.7.1	7	25.6	5.5	0.12	-21.9		GDDF-ES-F.14.1	14	56.1	4.8	0.07	14.1
	GDDF-TS-F.8.1	8	57.3	4.2	0.09	-18.3		GDDF-ES-F.14.2	14	100.0	7.7	0.10	-15.2
	GDDF-TS-F.8.2	8	70.6	3.3	0.10	-19.4		GDDF-ES-F.15.1	15	22.1	7.7	0.12	15.5
	GDDF-TS-F.10.1	10	108.5	6.6	0.12	22.3							
	GDDF-TS-F.11.1	11	14.3	5.8	0.11	-19.0							
	GDDF-TS-F.11.2	11	30.3	5.4	0.10	-19.6							
	GDDF-TS-F.17.1	17	120.9	8.1	0.18	27.3							
ALGERIA	GDDF-TS-A.2.1	2	11.5	6.4	0.13	26.0		GDDF-ES-A.2.1	2	14.9	5.6	0.10	27.1
	GDDF-TS-A.3.1	3	0.0	9.3	0.17	33.8		GDDF-ES-A.3.1	3	4.0	3.1	0.10	26.3
	GDDF-TS-A.5.1	5	66.4	7.5	0.15	33.8		GDDF-ES-A.3.2	3	65.6	6.0	0.09	33.0
	GDDF-TS-A.6.1	6	6.0	7.4	0.22	-35.3		GDDF-ES-A.4.1	4	8.1	9.0	0.15	-42.6
	GDDF-TS-A.17.1	17	124.9	4.7	0.10	21.9		GDDF-ES-A.4.2	4	32.2	10.1	0.18	39.3
							GDDF-ES-A.10.1	10	131.0	5.9	0.09	25.5	
							GDDF-ES-A.10.2	10	143.0	4.4	0.07	22.5	
							GDDF-ES-A.14.1	14	3.6	7.9	0.14	-29.2	
							GDDF-ES-A.14.2	14	56.1	6.4	0.09	24.4	

^a From the north of linkage group.

^b Percentage of individual phenotypic variance explained.

LG: Linkage group

LAF: leaf area at flowering; DWF: dry weight at flowering; GDDF: cumulative growing degree days from sowing to flowering.

Fig. 1: Daily mean temperature and precipitation during the growing season in 2007 in the two locations France and Algeria. The early sowing is shown as ES and the traditional sowing as TS. The dates of flowering for each sowing date are marked by the black circle.

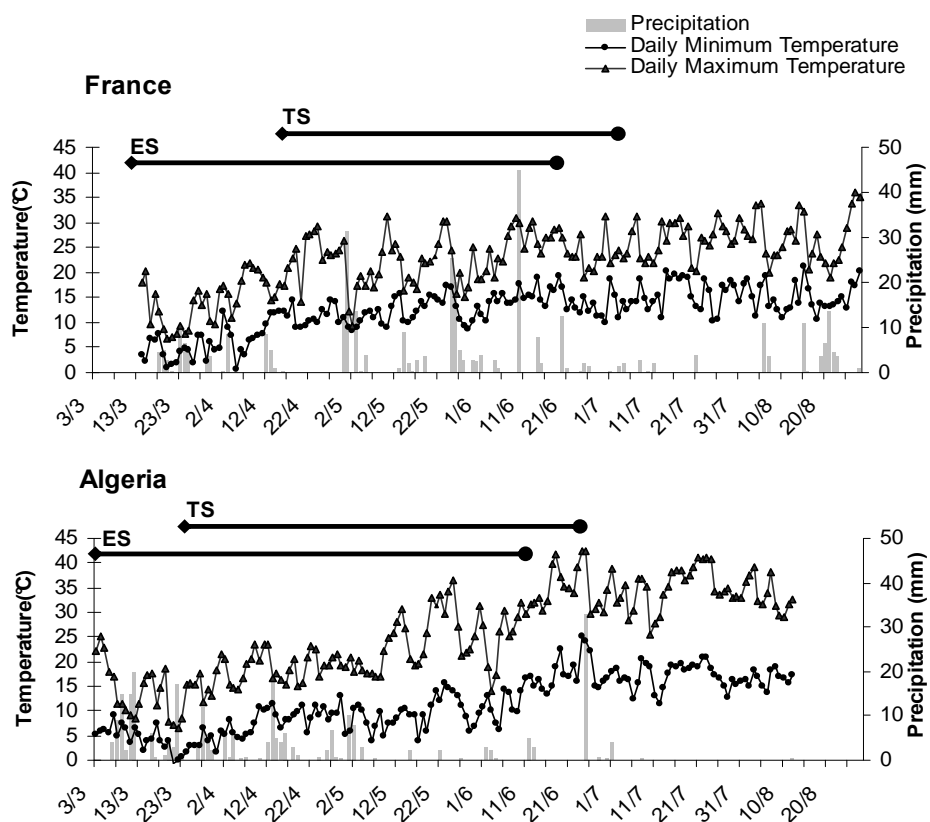


Fig. 2 : Sunflower genetic linkage map showing the position of QTL associated with cumulative growing degree days from sowing to flowering (GDDF), plant dry weight at flowering (DWF) and leaf area at flowering (LAF), detected in two locations, France (F) and Algeria (A) in early sowing (ES) and traditional sowing (TS) conditions. The positions of the QTLs are represented on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs.

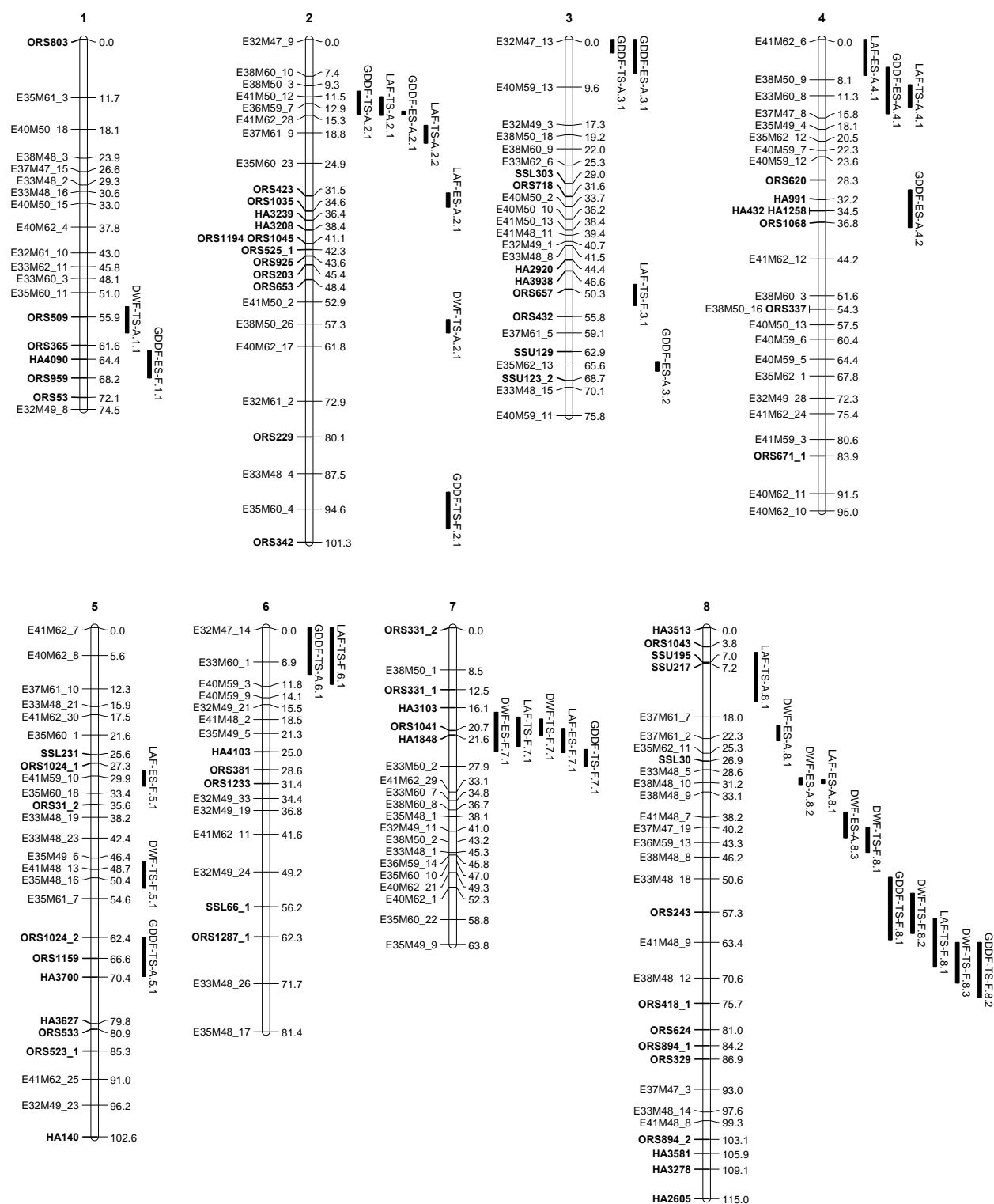


Fig. 2 : Continued

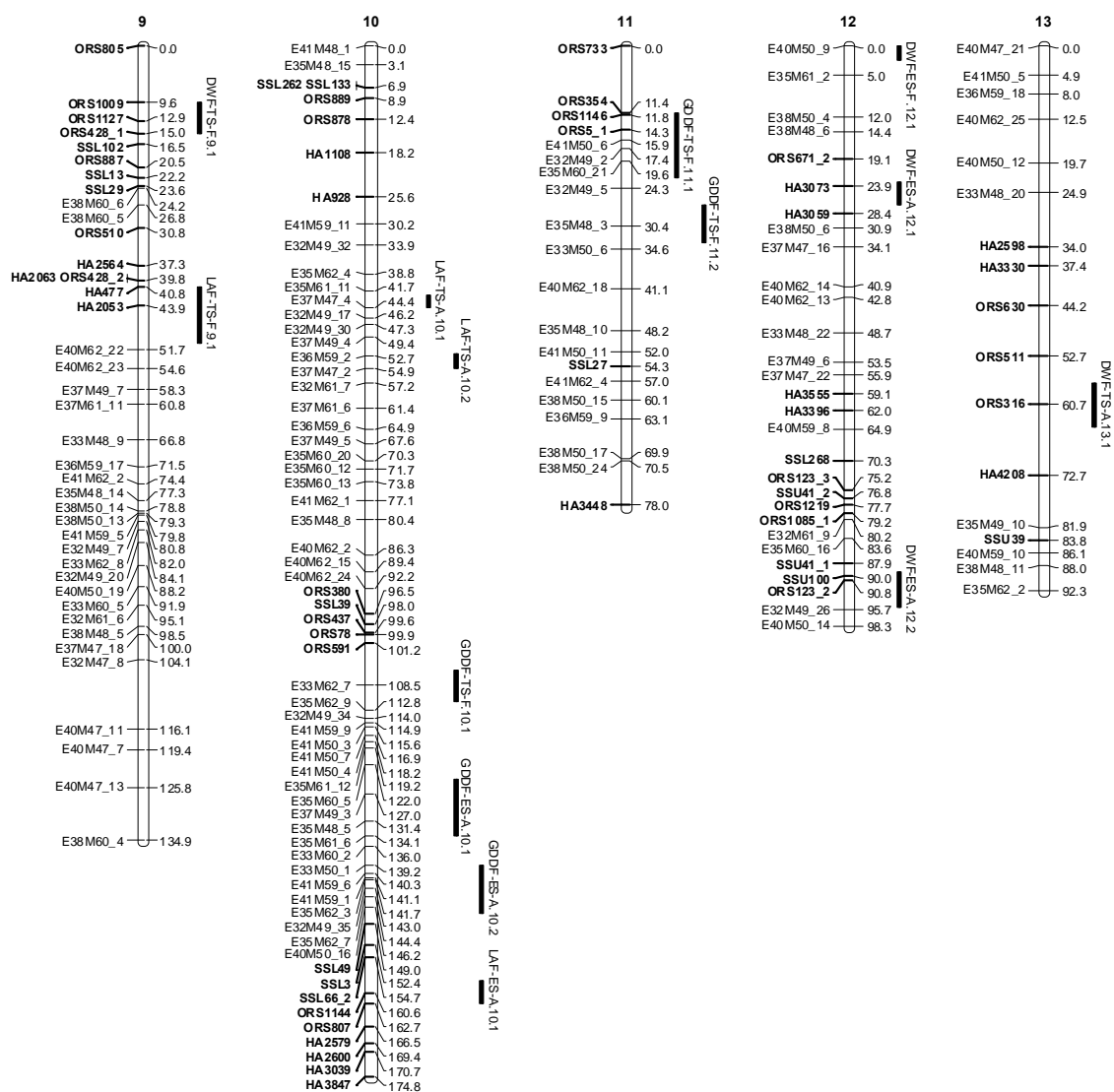
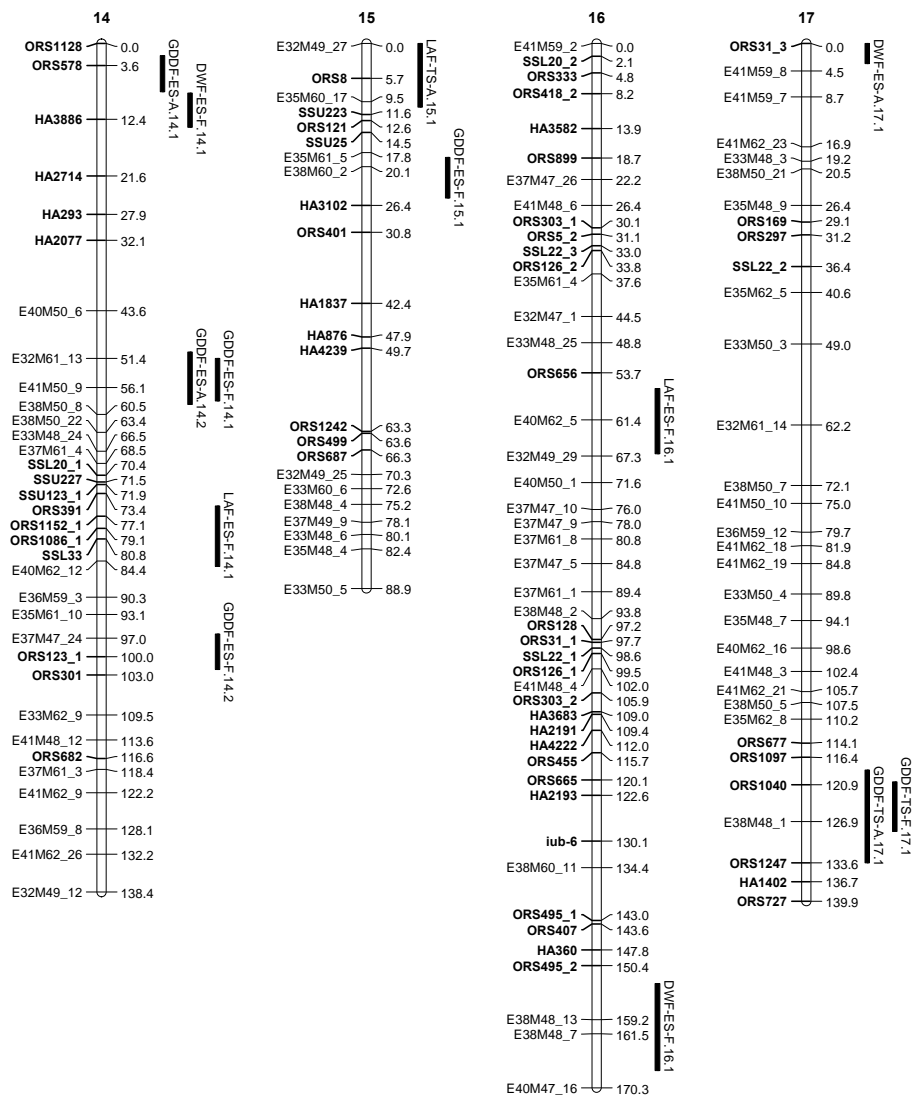


Fig. 2 : Continued



4.2.5 Genetic control of physiological traits for cold tolerance associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions

Clémentine Allinne¹, Pierre Maury¹, Ahmad Sarrafi^{2*}, Philippe Grieu^{1*}

¹Université de Toulouse; INPT; UMR AGIR; ENSAT, 31320 CASTANET TOLOSAN, France.

²Université de Toulouse; INPT ; IFR 40, Laboratoire SP2 ; ENSAT, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France.

* PhD supervisors

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Symbiose et Pathologie des Plantes

SP2, IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607,

31326 Castanet Tolosan,

France

E-mail: sarrafi@ensat.fr



Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions

Clémentine Allinne^a, Pierre Maury^a, Ahmad Sarrafi^{b,1,*}, Philippe Grieu^{a,1}

^a Université de Toulouse, INPT, UMR AGIR, ENSAT, 31320 Castanet Tolosan, France

^b Université de Toulouse, INPT, IFR 40, Laboratoire SP2, ENSAT, F-31326 Castanet Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2009

Received in revised form 7 June 2009

Accepted 2 July 2009

Available online 7 July 2009

Keywords:

Sunflower

Early sowing

Cold tolerance

Physiological traits

Genetic variability

QTL mapping

ABSTRACT

This study was conducted to identify physiological traits associated with cold tolerance in sunflower and to identify the genomic regions involved in their variation. A population of 98 recombinant inbred lines (RILs) and their two parents were sown in the field as usual sowing date (control) and one or two months earlier (long-term low temperature treatments). A trait commonly used to underlying cold tolerance related to the degree of membrane damage, as well as traits associated with growth capacity (chlorophyll content, potential photochemical efficiency of photosystem II and plant dry weight) and finally those reflecting acclimation mechanism to stress conditions (osmotic potential at full turgor, and specific leaf area) have been investigated at early development stages. Significant differences were observed among the three sowing dates for all traits. Chlorophyll content and specific leaf area are genetically associated with cold tolerance. Genetic gains were observed for chlorophyll content and osmotic potential traits in some of early sowing dates, which suggest that they could be used for cold tolerance in breeding programs. QTL analyses show that several putative genomic regions are involved in the variation of the physiological traits studied under low temperature. Major QTLs for cold tolerance associated with SSR markers such as ORS331_2 for the cell membrane stability should be checked in several environments to see if they can be used in marker-assisted selection programs.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sunflower is one of the most important oil crops worldwide. This summer crop is mainly cultivated under rather high temperature. Water deficit stress which can take place during critical periods of flowering and grain filling induces yield decline [1]. Two main strategies have been studied to maximize the sunflower production under drought stress conditions. The first way is to improve the drought tolerance of sunflower cultivars [2,3]. Early sowing is the second way to avoid the critical water stress period [4]. The effect of early sowing and winter planting has been studied in sunflower in several Mediterranean countries [5,6]. Authors have shown that early sowings improve the water availability [7] and increase the yield of the crop [8,6]. In temperate regions, early sowing compared with conventional sowing is associated with long-term low temperature exposure during first stages of development in sunflower.

Low temperature exposure has consequences for most biological processes. It initiates a number of physiological changes which lead the plant to be more cold tolerant [9]. Among the numerous metabolic changes, photosynthesis is the main physiological process studied under low temperature condition in many species including *Arabidopsis* [10], alfalfa [11], rice [12], maize [13], wheat [14] and barley [15]. Photosynthetic modifications are notably characterized by changes in photochemical efficiency [16,17] in response to photooxidation [18], photoprotection [13] and photoinhibition [14,19]. Accumulation of metabolites and low molecular weight solutes such as carbohydrates into the cytoplasm constitute another major metabolic change observed in plants after exposure to low temperature [20]. These solutes contribute to decrease the osmotic potential which leads to decrease the cytoplasmic freezing point and prevent dehydration in cells [21,22]. However, low temperature exposure can induced cell structural alterations as observed in several warm-season crop species [23] due to membrane lipid degradation [24].

The genetic dissection of the quantitative traits controlling the adaptive response of crops to abiotic stress is a prerequisite to allow cost-effective applications of genomics-based approaches to breeding programs [25]. Sunflower QTL mapping was conducted for agronomical traits [26–28], and for photosynthesis and water status traits under water stress condition [29,30]. QTLs for cold

* Corresponding author at: Laboratoire de Symbiose et Pathologie des Plantes, SP2, IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France. Tel.: +33 5 62193580; fax: +33 5 62193580.

E-mail address: sarrafi@ensat.fr (A. Sarrafi).

¹ PhD supervisors.

tolerance during the first stages of development has been identified in rice [31,12], winter wheat [32], maize [33,17] and sorghum [34]. As far as we know, no study in the literature refers to genetic analysis of physiological traits associated with cold tolerance in sunflower.

The objectives of this research are to study a set of physiological traits associated with cold tolerance, to understand which are affected in the first development stage in sunflower subjected to early sowing associated with long-term low temperature exposure and to analyze the genetic basis of low temperature tolerance in sunflower. Identifying physiological traits associated with molecular markers involved in low temperature tolerance would be useful in breeding programs.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and experimental conditions

A population of 98 RILs of sunflower (*Helianthus annuus*) and their parents RHA266 and PAC2 were sown in the field to investigate cold tolerance response under early sowing condition. Recombinant inbred lines were sown at three dates: usual sowing date as control (S3 in April) and one or two months earlier (S2 in March and S1 in February). For the last 10 years the mean temperature registered during April was 12.7 °C ranging from 7.9 °C to 17.5 °C, the mean temperature during March was 10.4 °C ranging from 5.6 °C to 15.2 °C and during February 7.5 °C ranging from 3.7 °C to 11.3 °C. Air temperature was recorded daily at 2 m above the soil surface close to the experimental site.

For each sowing date three replications per genotype were performed. The replications were two rows of 3 m long with 50 cm between rows and 25 cm between plants in rows. Each replication per genotype consisted of an experimental unit of 24 plants. Plants were exposed to periods of low temperature depending on the sowing dates (Fig. 1). Date of emergence was determined for each experimental unit when 50% of emergence was reached [35]. Sampling was realized at 800 °Cd in each sowing date. Cumulative degree days (°Cd) was calculated as the sum of the average daily temperature. Each sample consisted of the aerial part of a single plant per experimental unit. Samples have been placed 24 h at 4 °C before physiological traits measurement.

2.2. Trait measurements

Long-term low temperature exposure effects were determined using two photosynthetic, three non-photosynthetic traits and the plant dry weight measurement. The photosynthetic traits are chlorophyll fluorescence and chlorophyll content. Chlorophyll

fluorescence was performed with a pulse-amplitude modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany) for the younger fully expanded leaves after keeping 1 h under dark condition. The minimum fluorescence (F_0) and the maximum fluorescence (F_m) following a saturating light pulse ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured. The variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) and the ratio of variable maximum fluorescence (F_v/F_m) were calculated. The F_v/F_m ratio following a saturating light pulse represents a measure of the potential photochemical efficiency of photosystem II electron transport [36]. Chlorophyll content (CC) was determined with a portable SPAD-502 chlorophyll meter (Konica Minolta, Osaka, Japan). Measurements were performed for three samples through the middle section of the younger fully expanded leaves.

Non-photosynthetic traits studied are osmotic potential, relative electrolyte leakage and specific leaf area. Osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) was measured on expressed sap of frozen and thawed leaves using 10 mL aliquots placed in an osmometer (Wescor Model 5520, Logan, Utah, USA) calibrated with manufacturer solutions. The relative electrolyte leakage (REL) was performed according to the protocol of Campos et al. [24] using leaf discs (2 cm diameter) from young fully expanded leaves which were rinsed three times with demineralised water then placed in tube with 10 mL of demineralised water. Electrolyte leakage (EL) was measured with conductimeter (WTW LF 95, sonde TetraCon 96, Germany) after 24 h of floating at room temperature. Then, tubes were autoclaved for 15 min (121 °C) to kill the leaf tissue and release the total electrolytes (TE). Results were expressed as relative electrolyte content (REL) calculated as $(EL/TE) \times 100 (\%)$. The specific leaf area (SLA) was determined with discs (2 cm diameter) cut on the third fully expanded leaves and dried (48 h, 80 °C). SLA was calculated as leaf area/leaf dry weight ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$). The total aerial part of three plants per genotype per sowing date per replication was dried at 80 °C for 48 h and the plant dry weight (PDW) was determined.

2.3. Statistical analysis

Means comparison between the three sowing dates for each studied trait was tested with the Kruskal–Wallis test [37]. The normality of the traits distribution was tested with the Shapiro–Wilk test. For each sowing date, a mixed model with genotypes (RILs and parents) and replication effects, was used for analysis of the experimental data. Statistical analyses were performed with SPSS for Windows (15.0). Genetic gain for each trait was calculated as the differences between the mean of the top 10% selected RILs and the mean of the parents.

2.4. QTL analysis

The sunflower reference map recently constructed in our department by Poormohammad Kiani et al. [30] was used for detection of QTLs. The mapping population was developed through single seed descent from F2 plants derived from a cross between ‘PAC2’ and ‘RHA266’ [38]. RHA266 was obtained from a cross between wild *H. annuus* and Peredovik by USDA and PAC2 is an INRA-France inbred line from a cross between *H. petiolaris* and ‘HA61’ [39]. RHA266 compared to PAC2 have a higher values for yield, leaf area at flowering, and lower values for plant height and total dry matter [39–41]. Under water stress conditions the two parental lines differed significantly for leaf area at flowering, leaf area duration, plant height, total dry matter, head weight and seed quality traits [42,41]. This map consisted of 495 markers (304 AFLP and 191 SSR), placed in 17 linkage groups with a mean density of one locus for 3.7 cM. Each linkage group presumably corresponds

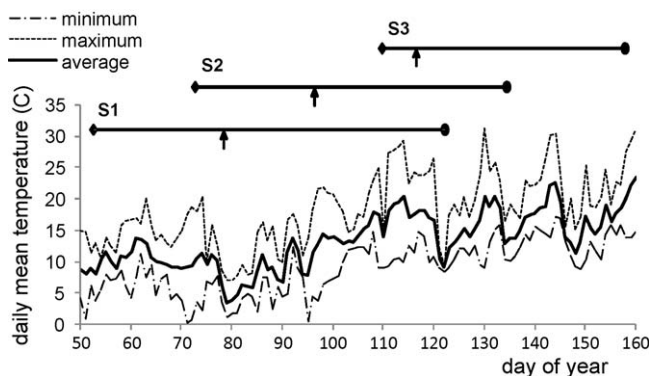


Fig. 1. Daily mean temperature during the growing season. The three sowing dates are indicated S1, S2 and S3. The dates of emergence are indicated by vertical arrows and the sampling date for each sowing date is marked by the black circle.

Table 1

Analysis of variance for physiological traits in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown in three sowing dates: one control sowing date (S3) and two early sowing dates associated with low temperature (S1 and S2).

Sowing date		Fv/Fm	CC	SLA	REL	OP _{FT}	PDW
S3	Mean	0.830 a	31.7 a	26.6 a	21.6 a	−0.64 a	3.84 a
	Range	0.711/0.862	21.2/45.2	17.9/36.9	13.6/37.5	−0.92/−0.44	0.74/18.21
	MS _G	0.001***	41.085***	15.182 ^{NS}	17.519 ^{NS}	0.011 ^{NS}	28.348***
S2	Mean	0.812 b	29.4 b	24.9 b	23.6 b	−0.74 b	2.38 b
	Range	0.634/0.855	18.5/41.0	16.2/33.7	15.8/34.1	−1.10/−0.56	0.34/10.80
	MS _G	0.001***	26.195***	12.919***	13.865**	0.006**	9.476***
S1	Mean	0.792 c	27.9 c	25.6 b	25.7 c	−0.76 c	0.67 c
	Range	0.594/0.858	19.5/35.0	18.0/34.5	16.4/38.1	−0.99/−0.58	0.05/2.42
	MS _G	0.002***	15.180***	13.221***	28.862***	0.006***	0.150 ^{NS}

Fv/Fm: potential photochemical efficiency of photosystem II; CC: chlorophyll content (SPAD values); SLA: specific leaf area (m²/kg); REL: relative electrolyte leakage (%); OP_{FT}: osmotic potential at full turgor (MPa); PDW: plant dry weight (g); MS_G: genotype mean square; NS: non-significant. Values with a common letter in the same column are not significantly different at $p = 0.05$ (Kruskal–Wallis test)

** Significant at 0.01 probability level.

*** Significant at 0.001 probability level.

to one of the 17 chromosomes in the haploid sunflower genome ($x = 17$) [30]. The QTL location was estimated with the composite interval mapping method of QTL Cartographer version 2.5 software [43,44] using mean values of the three replicates for each RIL in each sowing date. The control marker number and the window size were 15 and 15 cM, respectively. The LOD score criterion for QTL significance was estimated by mean of a permutation test with 1000 permutations [45]. Mapchart 2.1 was used for graphical presentation of linkage groups and map positions of the SSR and AFLP markers.

3. Results

Contrasted thermal conditions are observed for the three sowing dates (Fig. 1). The mean temperatures from sowing to sampling are lower in the two early sowing than in control with 11.7 °C for S1, 12.9 °C for S2 and 16.4 °C for S3. The mean temperature from sowing to emergence is lower in S1 (10.3 °C) and S2 (8.4 °C) compared with S3 (17.8 °C), whereas temperatures

recorded from emergence to sampling period are lower in S1 (12.4 °C) compared with S2 (15.6 °C) and S3 (16.2 °C).

The means comparison between the three sowing dates for the studied traits shows that sowing date has significant effect on all physiological traits (Table 1). A normal distribution was observed for the specific leaf area SLA and the osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) as presented in Fig. 2. According to the Shapiro–Wilk test the distribution of some other traits deviate from normality. As normalizing data through transformation may misrepresent differences among individuals by pulling skewed tails toward the centre of the distribution [45], all phenotypic analyses were performed on untransformed data. Significant differences are observed between S1, S2 and S3 for all the studied traits except for SLA, in which means of S1 and S2 are not significantly different. The mean values of the potential photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), chlorophyll content (CC), SLA, (OP_{FT}) and the plant dry weight (PDW) are lower in early sowing dates (S1 and S2) compared with the control S3 (Table 1). On the contrary, the mean value of REL is higher in S1 and S2 than in S3 (Table 2).

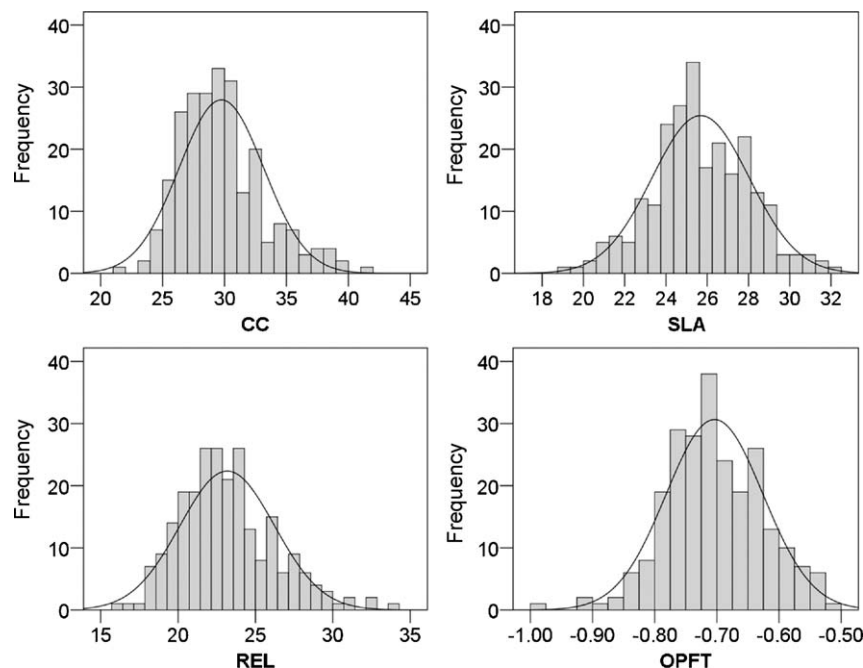


Fig. 2. Distribution for physiological traits: chlorophyll content—CC (SPAD values), the specific leaf area—SLA (m²/kg), the relative electrolyte leakage—REL (%) and the osmotic potential at full turgor—OPFT (MPa) in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown in three sowing dates.

Table 2

Genetic gain for physiological traits in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown in three sowing dates: one control sowing date (S3) and two early sowing dates associated with low temperature (S1 and S2).

Sowing date		Fv/Fm	CC	SLA	REL	OP _{FT}	PDW
S3	PAC2 (P1)	0.839	30.9	24.4	18.5	−0.65	2.15
	RHA266 (P2)	0.818	28.0	26.5	21.3	−0.68	2.15
	P1–P2	0.021 ^{NS}	2.88 ^{NS}	−2.0 ^{NS}	−2.8 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.00 ^{NS}
	\bar{X}_P	0.828	29.4	25.5	19.9	−0.66	2.15
	\bar{X}_{RIL}	0.830	31.8	26.6	21.6	−0.64	3.87
	$\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$	0.852	38.9	30.8	17.8	−0.75	11.28
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	0.002 ^{NS}	2.4 ^{NS}	1.2 ^{NS}	1.7 ^{NS}	0.02 ^{NS}	1.72 ^{NS}
	GG10% = $\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}} - \bar{X}_P$	0.023 ^{NS}	9.4^{***}	5.3 ^{NS}	−2.1 ^{NS}	−0.09 ^{NS}	9.13^{***}
S2	PAC2 (P1)	0.801	29.3	24.7	21.3	−0.71	0.91
	RHA266 (P2)	0.752	27.5	23.6	26.0	−0.72	1.43
	P1–P2	0.050 ^{**}	1.78 ^{NS}	1.0 ^{NS}	−4.7 ^{NS}	0.00 ^{NS}	−0.52 ^{NS}
	\bar{X}_P	0.777	28.4	24.1	23.7	−0.71	1.17
	\bar{X}_{RIL}	0.813	29.4	24.9	23.6	−0.74	2.40
	$\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$	2.006	34.5	28.3	20.4	−0.85	6.70
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	0.036 [*]	1.0 ^{NS}	0.8 ^{NS}	0.0 ^{NS}	−0.03 ^{NS}	1.23 ^{NS}
	GG10% = $\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}} - \bar{X}_P$	1.229^{***}	6.1^{***}	4.1 ^{NS}	−3.3 ^{NS}	−0.14^{***}	5.53^{***}
S1	PAC2 (P1)	0.838	29.8	24.8	23.3	−0.75	0.89
	RHA266 (P2)	0.793	28.9	26.6	25.7	−0.72	0.90
	P1–P2	0.045 ^{NS}	0.91 ^{NS}	−1.9 ^{NS}	−2.4 ^{NS}	−0.03 ^{NS}	−0.01 ^{NS}
	\bar{X}_P	0.815	29.3	25.7	24.5	−0.74	0.89
	\bar{X}_{RIL}	0.791	27.9	25.6	25.7	−0.76	0.67
	$\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$	0.831	31.7	29.3	20.7	−0.85	1.10
	$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	−0.024 ^{NS}	−1.4 ^{NS}	−0.2 ^{NS}	1.2 ^{NS}	−0.02 ^{NS}	−0.22 ^{NS}
	GG10% = $\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}} - \bar{X}_P$	0.016 ^{NS}	2.4 ^{NS}	3.6 ^{NS}	−3.8 ^{NS}	−0.12^{***}	0.21 ^{NS}

Fv/Fm: potential photochemical efficiency of photosystem II; CC: chlorophyll content (SPAD values); SLA: specific leaf area (m²/kg); REL: relative electrolyte leakage (%); OP_{FT}: osmotic potential at full turgor (MPa); PDW: plant dry weight (g). The significant differences are presented as bold-face. 'PAC2' (P1) and 'RHA266' (P2): parental lines; \bar{X}_P : mean of two parental lines; \bar{X}_{RIL} : mean of recombinant inbred lines (RILs); $\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$: the mean of the top 10% selected RILs; GG10%: genetic gain when the mean of the top 10% selected RILs is compared with the mean of the parents. NS: non-significant.

* Significant at 0.05 probability level.

** Significant at 0.01 probability level.

*** Significant at 0.001 probability level.

Analysis of variance of the 98 recombinant inbred lines and their parents ('PAC2' and 'RHA266') is summarized in Table 1. Photosynthetic traits (Fv/Fm and CC) present significant differences between genotypes for each sowing date. Non-photosynthetic traits SLA, REL and OP_{FT}, show significant variability only for S1 and S2. Concerning the plant dry weight (PDW), significant genotypic variability is observed in S2 and S3. The difference between the two parents is significant only for Fv/Fm in S2 (Table 2), in spite of the existence of genetic variability in RILs for all traits (Table 1). Differences for the mean value of all traits between RILs (\bar{X}_{RIL}) and their parents (\bar{X}_P) are not significant, except for Fv/Fm in S2 (Table 2). Genetic gain, as the difference between the mean of 10% selected RILs ($\bar{X}_{10\% \text{ best RIL}}$) and the mean of parents (\bar{X}_P), is significant for OP_{FT} in S1 and S2, for Fv/Fm in S2 and for CC and PDW in S3.

The map position and the characteristics of QTLs associated with the studied traits for the three sowing dates are presented in Table 3. For an easier overview of overlapping QTLs between the traits and the sowing dates, an image of all QTL regions is presented in Fig. 3. Three to nine QTLs are identified depending to the traits and sowing dates. QTLs explain from 4.6% to 23% of the phenotypic variance of the traits (R^2). Additive effects present positive or negative values showing that both parental lines contribute to the expression of the different traits. The largest amount of phenotypic variance explains by a QTL detected for Fv/Fm is 22% (Fv/Fm-S3-16.2). This QTL is co-located with two overlapping QTLs detected for CC in S2 and S3 conditions. The most important QTL for CC is identified on linkage group 9 (ORS805) and explains 19% of the total phenotypic variance. The major QTL for SLA (SLA-S3-16.1) is located on the linkage group 16 and explain 22% of the phenotypic variance. The most important QTL detected for REL on the linkage group 7 is associated with the SSR marker ORS331_2 and explain 23% of the phenotypic variance. This QTL is identified in the two

early sowing dates (S1 and S2). The major QTL for PDW (PDW-S3-5.1) explains 20% of phenotypic variance in S3 and is overlapped with QTL detected for PDW in S2. Among the identified QTLs, one is stable for SLA across the three sowing dates on linkage group 12 (Table 3). Two QTLs are common between S1 and S2 for REL on linkage group 7 and for OP_{FT} on linkage group 10. Eight QTLs are common between S2 and S3 for Fv/Fm (linkage group 9), for CC (linkage groups 2, 12 and 16) and for PDW (linkage groups 5, 15 and 17).

Overlapping QTLs between traits are observed mainly in control sowing date. In S3, QTL for plant dry weight (PDW) is co-located with the QTL detected for REL on linkage group 4 and with the QTL detected for Fv/Fm on the linkage group 15. Two QTLs detected for Fv/Fm are co-located with QTLs identified for CC in linkage groups 15 and 16. Overlapping QTLs for CC, OP_{FT} and SLA are also detected in the linkage group 9. In the early sowing S1, QTLs for SLA and REL are co-located in linkage group 4.

4. Discussion

Physiological changes induced by low temperature affected all the traits studied. Non-significant differences were found for all traits studied between the means of the RILs and the mean of the parents (Table 2). This indicates that the RILs are representative of possible genotypic combinations of the two parents for the studied traits, as it was also previously reported by Poormohammad Kiani et al. [30], for the water status and the osmotic adjustment of sunflower under two water treatments. Genetic gain was significant for the chlorophyll content (CC) and plant dry weight (PDW) in S2 and S3 and for the osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) in S1 and S2 (Table 2). This might be due to positive transgressive segregation resulting from the accumulation of favorable alleles in some RILs. Transgressive segregation has

Table 3

Map position and effect of QTLs for potential photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), chlorophyll content (CC), specific leaf area (SLA), relative electrolyte leakage (REL), osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) and plant dry weight (PDW) detected in RILs under three sowing conditions: one control sowing date (S3) and two early sowing dates associated with low temperature (S1 and S2). The threshold level of the LOD score for each trait was estimated by means of a permutation test with 1000 permutations.

Sowing date	Trait	QTL	Linkage group	Nearest marker	Position cM ^a	LOD score	R ^{2b}	Additive effect
S3	Fv/Fm	Fv/Fm-S3-9.1	9	HA477	42.8	3.9	0.12	−0.007
		Fv/Fm-S3-10.1	10	E35M61_11	41.7	3.5	0.07	−0.005
		Fv/Fm-S3-14.1	14	ORS301	103.0	3.6	0.11	0.007
		Fv/Fm-S3-15.1	15	E35M48_4	86.4	3.6	0.11	−0.007
		Fv/Fm-S3-16.1	16	E37M47_10	76.0	5.0	0.17	−0.009
		Fv/Fm-S3-16.2	16	E37M61_1	89.4	6.6	0.22	−0.010
	CC	CC-S3-2.1	2	E41M50_12	11.5	4.1	0.07	1.386
		CC-S3-6.1	6	E41M48_2	18.5	7.4	0.16	−2.038
		CC-S3-9.1	9	ORS805	2.0	7.3	0.19	−1.721
		CC-S3-12.1	12	ORS671_2	21.1	3.2	0.07	1.072
		CC-S3-16.1	16	ORS418_2	8.2	3.5	0.07	1.095
		CC-S3-16.2	16	E37M47_5	86.8	5.1	0.12	−1.523
	SLA	SLA-S3-2.1	2	E35M60_4	98.6	3.6	0.08	−0.726
		SLA-S3-7.1	7	E33M50_2	27.9	3.7	0.07	0.673
		SLA-S3-9.1	9	ORS1009	9.6	6.0	0.16	0.996
		SLA-S3-12.1	12	E40M50_9	2.0	3.9	0.09	−0.755
		SLA-S3-13.1	13	HA3330	37.4	3.4	0.08	−0.715
		SLA-S3-14.1	14	E41M62_9	126.2	3.7	0.09	−0.714
		SLA-S3-16.1	16	ORS303_2	105.9	7.7	0.22	−1.168
	REL	REL-S3-4.1	4	HA991	34.2	4.8	0.10	−1.209
		REL-S3-4.2	4	E40M59_6	60.4	7.1	0.12	1.268
		REL-S3-9.1	9	E33M60_5	91.9	4.2	0.07	−0.857
		REL-S3-10.1	10	E37M49_5	67.6	8.0	0.14	1.559
		REL-S3-10.2	10	E35M62_9	112.8	11.9	0.23	−2.254
		REL-S3-13.1	13	E40M47_21	0.0	5.9	0.11	0.902
	OP _{FT}	OPFT-S3-5.1	5	E41M62_7	0.0	4.3	0.10	0.022
		OPFT-S3-7.1	7	ORS331_2	0.0	4.8	0.15	−0.027
		OPFT-S3-9.1	9	ORS805	0.0	3.1	0.10	0.020
	PDW	PDW-S3-2.1	2	E38M50_26	61.3	3.7	0.08	−0.997
		PDW-S3-4.1	4	E40M59_12	25.6	4.5	0.11	−1.306
		PDW-S3-4.2	4	E40M59_6	64.4	5.0	0.09	1.203
		PDW-S3-5.1	5	HA3700	70.4	8.9	0.20	−1.751
		PDW-S3-13.1	13	HA4208	72.7	3.8	0.09	1.026
		PDW-S3-14.1	14	ORS1128	0.0	7.1	0.16	1.417
		PDW-S3-15.1	15	E35M48_4	84.4	4.9	0.13	−1.530
		PDW-S3-17.1	17	E41M48_3	102.4	4.5	0.10	−1.214
		PDW-S3-17.2	17	E35M62_8	110.2	3.5	0.07	−1.063
S2	Fv/Fm	Fv/Fm-S2-7.1	7	ORS331_1	12.5	6.2	0.13	−0.008
		Fv/Fm-S2-7.2	7	HA1848	25.6	3.4	0.10	−0.007
		Fv/Fm-S2-8.1	8	SSU217	7.2	8.1	0.16	0.010
		Fv/Fm-S2-9.1	9	HA2053	43.9	3.1	0.06	−0.005
		Fv/Fm-S2-15.1	15	E37M49_9	78.1	3.7	0.07	−0.006
	CC	CC-S2-1.1	1	E40M50_18	20.1	3.5	0.07	0.954
		CC-S2-2.1	2	E41M50_12	11.5	4.0	0.06	0.894
		CC-S2-4.1	4	E35M62_1	71.8	7.4	0.14	1.414
		CC-S2-10.1	10	E35M61_6	134.1	3.6	0.06	0.970
		CC-S2-12.1	12	ORS671_2	23.1	4.4	0.08	0.889
		CC-S2-14.1	14	E32M61_13	51.4	3.7	0.08	0.886
		CC-S2-15.1	15	ORS687	66.3	3.4	0.06	0.773
		CC-S2-16.1	16	E37M47_5	86.8	3.8	0.07	−0.887
	SLA	SLA-S2-5.1	5	E41M62_30	17.5	4.7	0.08	−0.637
		SLA-S2-8.1	8	SSL30	26.9	7.7	0.14	−0.853
		SLA-S2-8.2	8	E37M47_19	40.2	3.5	0.09	−0.689
		SLA-S2-10.1	10	E35M62_4	38.8	3.8	0.07	0.669
		SLA-S2-11.1	11	E36M59_9	65.1	4.6	0.09	0.714
		SLA-S2-12.1	12	E40M50_9	0.0	3.4	0.06	−0.576
		SLA-S2-14.1	14	ORS1128	0.0	3.3	0.07	0.595
		SLA-S2-15.1	15	SSU223	11.6	3.4	0.05	0.544
	REL	REL-S2-5.1	5	E35M60_1	25.6	4.4	0.09	−0.752
		REL-S2-5.2	5	E35M49_6	48.4	6.0	0.21	1.168
		REL-S2-6.1	6	E41M48_2	18.5	7.5	0.15	−1.212
		REL-S2-7.1	7	ORS331_2	2.0	9.5	0.23	−1.192
		REL-S2-11.1	11	ORS354	11.4	4.1	0.08	0.688
		REL-S2-13.1	13	E33M48_20	32.9	7.6	0.18	1.071
		REL-S2-13.1	13	ORS316	60.7	5.2	0.11	−0.840
	OP _{FT}	OPFT-S2-10.1	10	E32M61_7	59.2	4.9	0.11	−0.031
		OPFT-S2-10.2	10	HA2579	166.5	3.3	0.08	0.022

Table 3 (Continued)

Sowing date	Trait	QTL	Linkage group	Nearest marker	Position cM ^a	LOD score	R ^{2b}	Additive effect
S1	PDW	OPFT-S2-14.1	14	HA2714	21.6	3.5	0.10	0.023
		OPFT-S2-15.1	15	E38M60_2	20.1	3.8	0.07	0.018
		OPFT-S2-16.1	16	E37M47_26	22.2	4.8	0.11	−0.022
		OPFT-S2-16.2	16	E38M48_7	161.5	5.1	0.10	0.021
		PDW-S2-1.1	1	HA4090	66.4	3.6	0.09	0.529
		PDW-S2-5.1	5	HA3700	70.4	3.3	0.07	−0.499
		PDW-S2-10.1	10	SSL49	151.0	3.8	0.09	−0.603
		PDW-S2-10.2	10	ORS807	162.7	4.9	0.11	−0.647
		PDW-S2-15.1	15	E35M48_4	86.4	3.8	0.10	−0.692
		PDW-S2-17.1	17	ORS297	31.2	3.4	0.06	0.520
		PDW-S2-17.2	17	E41M48_3	102.4	5.9	0.13	−0.702
		PDW-S2-17.3	17	E35M62_8	110.2	3.0	0.07	−0.519
	Fv/Fm	Fv/Fm-S1-10.1	10	E35M61_6	131.0	6.0	0.13	−0.017
		Fv/Fm-S1-14.1	14	ORS391	73.4	4.0	0.09	0.009
		Fv/Fm-S1-17.1	17	E41M48_3	102.4	4.4	0.10	−0.010
	CC	CC-S1-5.1	5	E41M62_30	19.5	4.9	0.12	−0.987
		CC-S1-14.1	14	HA3886	14.4	3.2	0.11	−0.789
		CC-S1-17.1	17	ORS1040	120.4	6.8	0.16	1.151
	SLA	SLA-S1-4.1	4	E37M47_8	17.8	5.2	0.13	0.934
		SLA-S1-12.1	12	E40M50_9	0.0	3.7	0.07	−0.598
		SLA-S1-13.1	13	ORS511	52.7	6.5	0.15	0.978
		SLA-S1-14.1	14	E41M48_12	115.6	3.9	0.08	0.743
	REL	REL-S1-2.1	2	E32M47_9	2.0	3.9	0.11	1.176
		REL-S1-4.1	4	E35M49_4	18.1	6.0	0.12	−1.914
		REL-S1-5.1	5	ORS533	80.9	4.3	0.11	−1.198
		REL-S1-7.1	7	ORS331_2	0.0	7.3	0.17	−1.549
		REL-S1-17.1	17	E38M48_1	128.9	3.5	0.11	−1.105
	OP _{FT}	OPFT-S1-1.1	1	E33M48_2	29.3	5.4	0.12	−0.018
		OPFT-S1-5.1	5	E37M61_10	12.3	6.3	0.12	−0.021
		OPFT-S1-5.2	5	E41M59_10	31.9	3.1	0.10	0.016
		OPFT-S1-10.1	10	ORS1144	162.7	4.8	0.11	−0.017
		OPFT-S1-11.1	11	ORS1146	11.8	6.1	0.12	0.018
		OPFT-S1-13.1	13	ORS316	72.7	4.6	0.10	−0.016
		OPFT-S1-15.1	15	E35M48_4	82.4	3.9	0.07	−0.014
		OPFT-S1-16.1	16	E38M60_11	138.4	6.0	0.17	−0.021
		OPFT-S1-17.1	17	E35M62_5	40.6	3.4	0.07	0.014
	PDW	PDW-S1-9.1	9	ORS428_2	39.8	5.6	0.14	0.112
		PDW-S1-14.1	14	ORS1128	0.0	3.6	0.09	0.081
		PDW-S1-16.1	16	HA3582	13.9	4.8	0.13	−0.103
		PDW-S1-16.2	16	E32M47_1	44.5	4.8	0.17	0.148

^a From the north of linkage group.^b Percentage of individual phenotypic variance explained.

already been observed for drought adaptive traits on the same RIL population [42,46]. QTLs identified in the present study showed that several putative genomic regions were involved in the expression of the physiological traits under the three sowing dates (Table 3). The positive and negative signs of additive effect at the different loci indicated the genetic contribution of both parental lines. This confirms the transgressive segregation observed at phenotypic level. Most of QTLs were detected only in one specific environmental condition and constitute adaptive QTLs [25]. The analysis of genes expression showed that 108 cDNA clones were found to be differentially expressed in response to low temperature in sunflower and about 90% of these genes were down regulated [47]. It has been established that the expression of hundreds of genes is altered in response to low temperature [48].

REL was higher after long-term low temperature exposure compared to control (S3) (Table 1) which shows that low temperature leads to a decrease in cell membrane stability. Higher cell membrane stability (which is associated with low values of REL) in response to cold stress after long-term low temperature exposure is considered as a cold acclimation process [10]. This phenomenon was reported in *Arabidopsis* and in rose clover [10]. In contrast, our results show that the cell membrane stability in RILs studied was lower after a long-term low temperature exposure

indicating cold damage. This confirms results obtained by Hewezi et al. [47]. The authors have evaluated the frost tolerance of sunflower at −3.8 °C, −4.8 °C and −5.8 °C by measurements of electrolyte leakage. They found that after exposure to low temperature, no cold acclimation but cold damage was observed in the sunflower genotypes studied. In our study, the most important QTL for REL found on linkage group 7 linked to the SSR marker (ORS331_2), was common between S1 and S2 (Table 3). These genomic regions should be more investigated to see if they present QTLs related to cold tolerance which are stable in many environments and also in other genetic backgrounds, then they should be used for marker-assisted selection programs.

The long-term low temperature exposure induced a reduction of growth capacity as indicated by the reduction of photosynthetic activity (CC and Fv/Fm) and a reduction of dry matter accumulation (Table 1). Common genomic regions were involved between S2 and S3 conditions for photosynthetic traits and dry matter accumulation on the linkage groups 2, 9, 12, and 15–17 (Fig. 3). Two regions in linkage groups 10 and 16 were detected where QTLs for photosynthetic traits (Fv/Fm and CC) were co-located. These two genomic regions should contain genes with pleiotropic effect which control at the same time efficiency of photosystem II and chlorophyll content. A strong reduction of the plant dry matter was

observed in S1 compared to S2 and S3 (Table 1). Low temperatures did not occur during the same period of plant development for S1 and S2 (Fig. 1): plants in S1 were maintained at low temperature after emergence stage whereas in S2, the temperature after

emergence was close to control condition (daily mean temperature of 15.6 °C and 16.2 °C for S2 and S3, respectively). Photosynthetic apparatus has been activated for S2 and S3 under the same temperature conditions whereas in S1 temperatures were colder

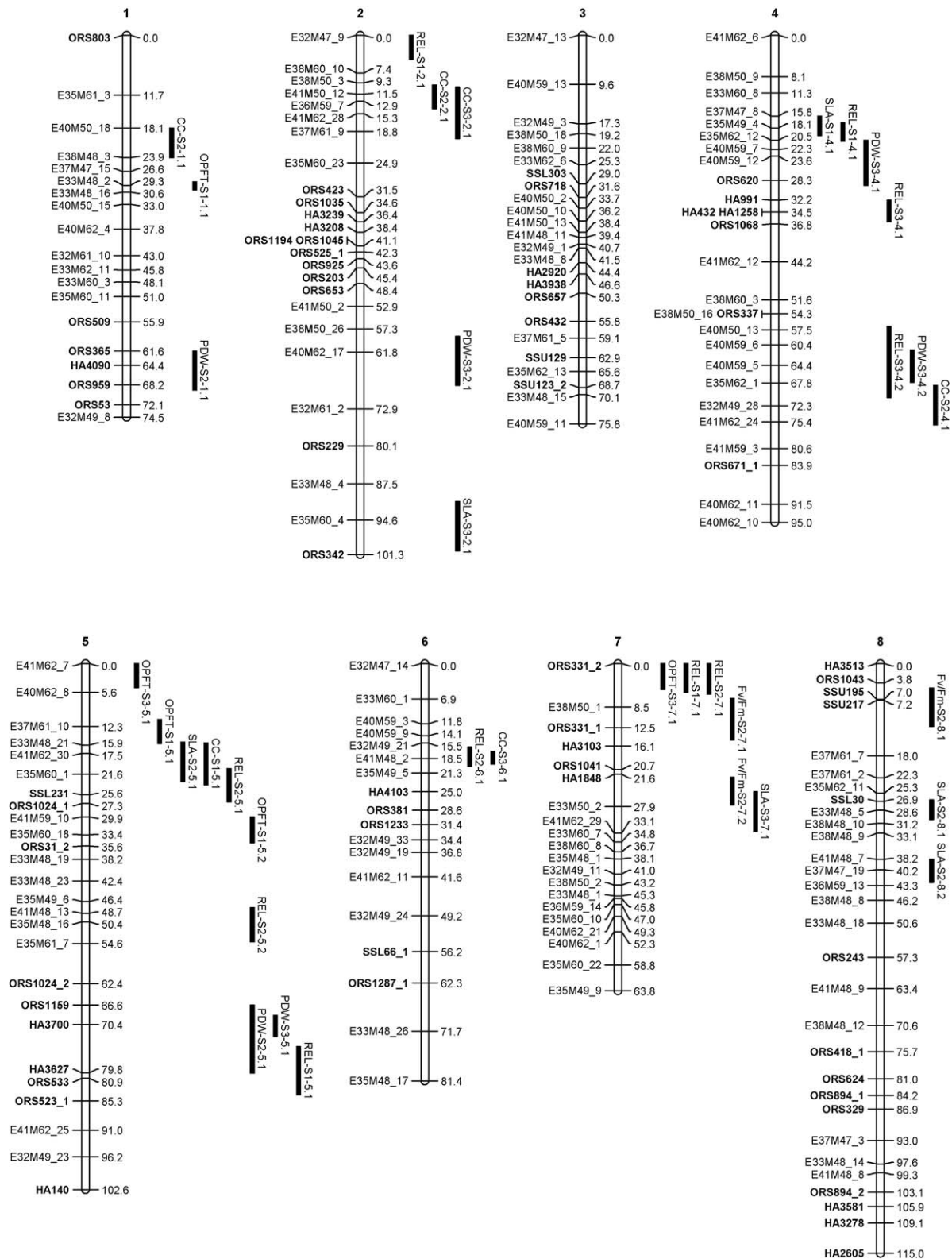


Fig. 3. Sunflower genetic linkage map showing the position of QTL associated with physiological traits in three sowing dates: one control sowing date (S3) and two early sowing dates associated with low temperature (S1 and S2). The physiological traits investigated are the potential photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), the chlorophyll content (CC), the specific leaf area (SLA), the relative electrolyte leakage (REL), the osmotic potential at full turgor (OPFT) and the plant dry weight (PDW). The positions of the QTLs are represented on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs.

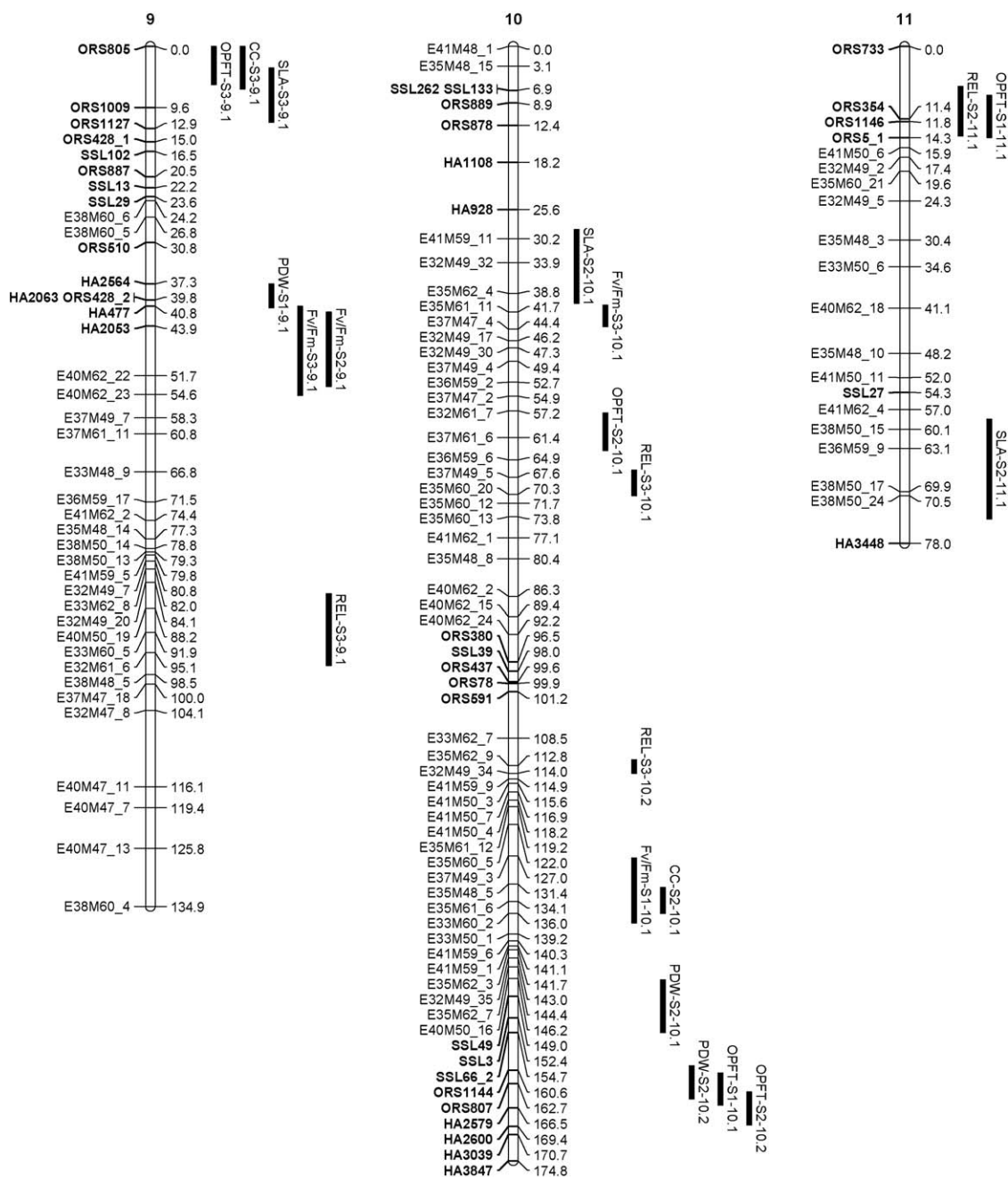


Fig. 3. (Continued).

on this stage. These low temperatures occurring in S1 have probably induced the detection of specific QTLs associated to low temperature adaptation of the photosynthetic apparatus. The effect of low temperature on photosynthetic efficiency has been reported in *Arabidopsis thaliana* [10], maize [49], rice [50], wheat [14] and barley [15] but as far as we know, it is not studied in sunflower. In our study, plants grown under low temperature conditions were characterized by a lower photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm) compared with plants grown in control condition (S3). As shown in wheat, the decrease in the photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm) can result from the photodamage of the D1 protein of PSII reaction centres and the increase of dissipating excitation energy in the PSII antennae as heat [14]. Low temperature exposure induced lower chlorophyll content compared with control (Table 1). This could reflect the photoprotective process due to the modification of the pigment

composition to improve the ability to dissipate the excess light energy as heat via the xanthophyll cycle [51,52]. Photoprotective process leads to a decrease of the chlorophyll content and an increase of the zeaxanthin content as shown by Leipner et al. [53] in maize under low temperature condition. Specific QTLs detected for CC, Fv/Fm and PDW in S1 may be involved in these acclimation processes. These QTLs associated with SSRs marker as ORS331_1 for photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), ORS1040 for the chlorophyll content (CC) and ORS428_2 for the plant dry weight (PDW) could be QTLs of interest for cold acclimation of the growth capacity. Co-located QTLs for CC and REL traits in S1 were detected in the linkage group 17. This genomic region may be implied in cold tolerance and growth acclimation to low temperature (Fig. 3).

Early sowing associated with low temperature induced a significant reduction of the specific leaf area (SLA). In our experiment, sunflower shows a significant genetic variability for

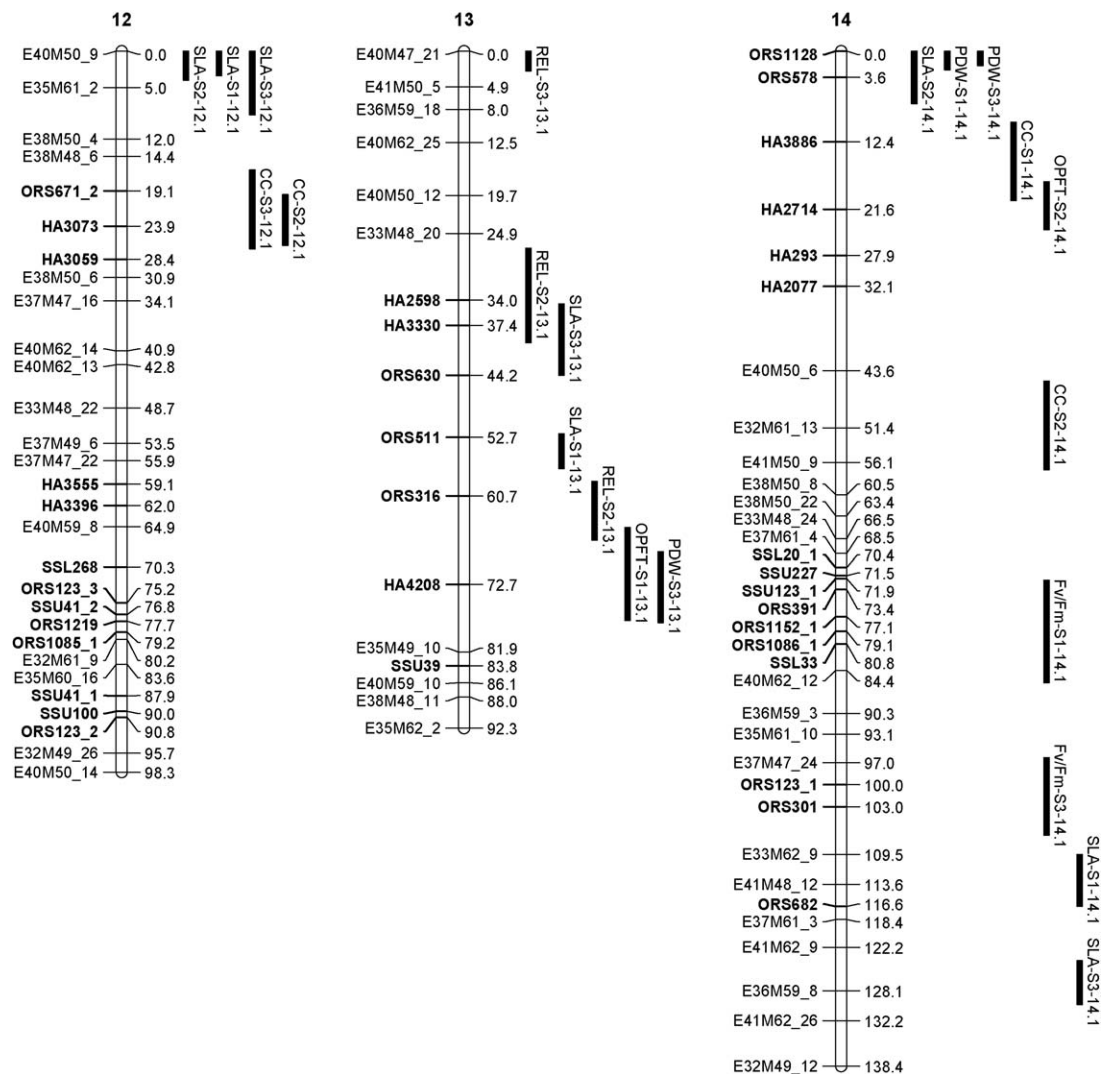


Fig. 3. (Continued).

SLA in response to low temperature. On linkage group 12, one region was detected where QTLs for SLA were co-located in all conditions indicated that this genomic region is stable for the control of the SLA (Fig. 3). Two overlapped QTLs between SLA and REL were detected on the linkage group 4 in S1 and on the linkage group 5 in S2, which show that SLA may be a component of cold tolerance. This phenomenon has been also reported in maize [54–56] and different annual legumes [57]. Verheul et al. [56] suggested that low SLA could arise from thicker leaves due to a thicker mesophyll and wax layers and a thicker cuticle. These morphological modifications are similar to xerophytic adaptation, and are commonly exhibited by freeze-tolerant plants [58].

Low temperature implied a decrease of the osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) (Table 1). This indicates an increase of the intracellular osmolyte concentration in sunflower genotypes in response to low temperature exposure. The osmotic potential presented a substantial genetic variability after low temperature exposure (Table 1), which shows that the osmotic potential is a useful trait to screen genotypes under low temperature treatment. This trait is a well-known indicator for cold acclimation in Citrus, Spinach and Petunia [22], white clover [59] and Puma Rey [21]. The locations of QTLs identified in the present study for osmotic potential at full turgor (OP_{FT}) when compared with those controlling water status related traits reported by Poormohammad

Kiani et al. [30], showed overlapping on linkage groups 1, 5, 9, 16 and 17. On linkage group 16 we have identified the QTL, *OPF-S2-16.1* under low temperature condition which is overlapped with five QTLs identified by Poormohammad Kiani et al. [30] for relative water content, leaf water potential, turgor potential and osmotic potential at full turgor under water stress condition. This suggests that osmotic regulation observed in response to cold and drought stress were regulated by common genomic region. It was shown by Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki [60] in *Arabidopsis* that the same genes (dehydration-responsive elements) were activated for osmotic regulation under cold and drought stress.

The whole results of our experiment do highlight that long-term low temperature exposure leads to a decrease in cell membrane stability associated with a decrease of the plant growth capacity (decrease of the plant dry weight, reduction of the chlorophyll content and the potential photochemical efficiency of photosystem II) and the osmotic potential at full turgor. We have also identified the traits associated with cold tolerance, as CC and SLA which are genetically related to REL. These traits would be more investigated to be used to screen genotypes of sunflower for cold tolerance improvement. Genomic regions presenting QTLs associated with SSR markers for REL are interesting for cold tolerance and should be more investigated for their stability across different environments.

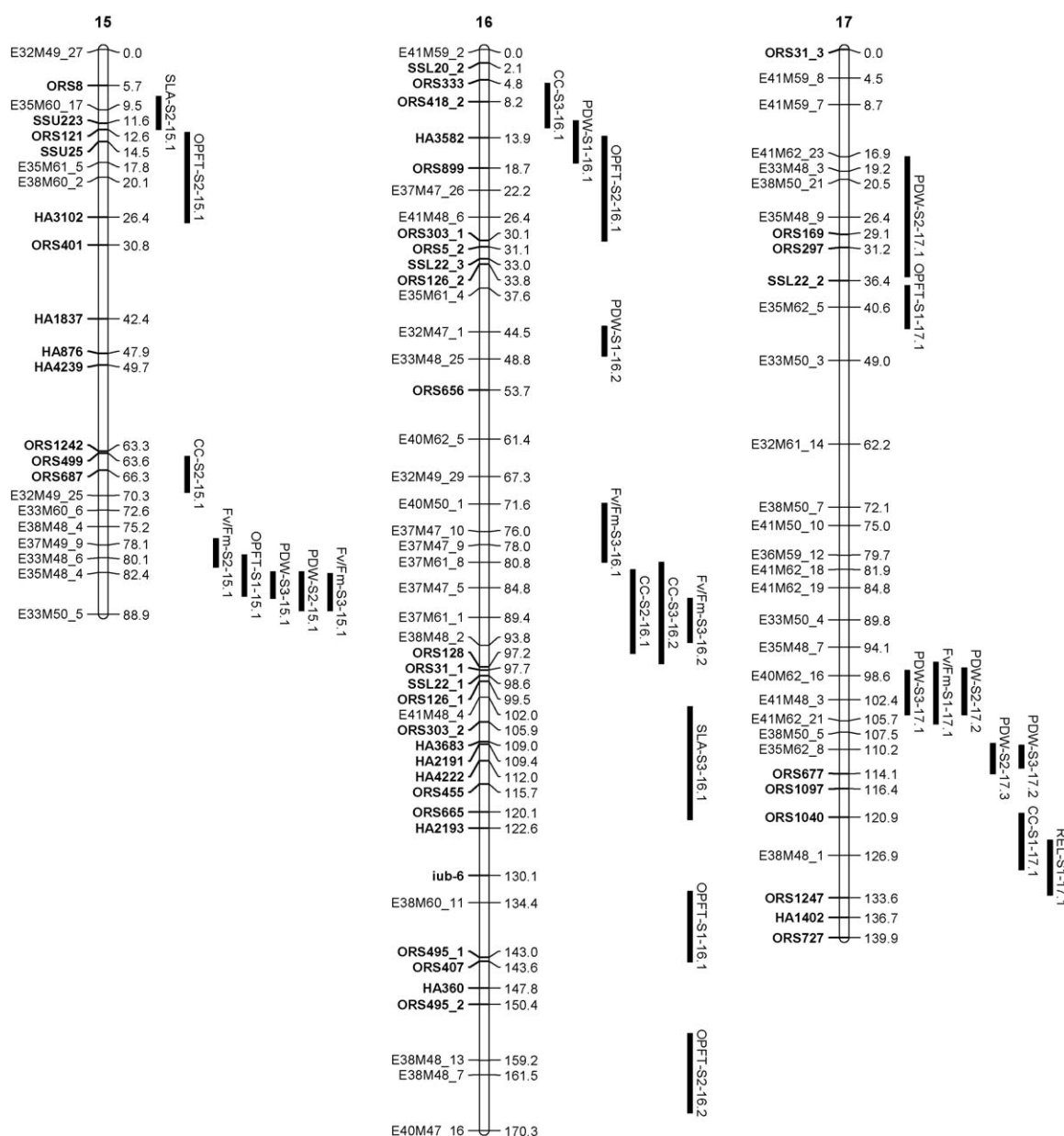


Fig. 3. (Continued).

Acknowledgements

The authors thank Michel Labarrère and Morgane Le Pogamp for technical assistance.

References

- [1] Z. Flagella, T. Rotunno, E. Tarantino, R. Di Caterina, A. De Caro, Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime, *Eur. J. Agron.* 17 (2002) 221–230.
- [2] P. Maury, F. Mojayad, M. Berger, C. Planchon, Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes, *Physiol. Plant.* 98 (1996) 57–66.
- [3] G.A. Pereyra-Irujo, L. Velázquez, C. Granier, L.A.N. Aguirrezábal, A method for drought tolerance screening in sunflower, *Plant Breed.* 126 (2007) 445–448.
- [4] V. Gimeno, J. Fernandez-Martinez, E. Fereres, Sunflower response to winter plantings in a mediterranean environment, *Helia* 8 (1985) 63–67.
- [5] A.J. de la Vega, A.J. Hall, Effects of planting date, genotype, and their interactions on sunflower yield. II. Components of oil yield, *Crop Sci.* 42 (2002) 1202–1210.
- [6] V. Gimeno, J. Fernandez-Martinez, E. Fereres, Winter planting as a means of drought escape in sunflower, *Field Crop Res.* 22 (1989) 307–316.
- [7] M.A. Soriano, F. Orgaz, F.J. Villalobos, E. Fereres, Efficiency of water use of early plantings of sunflower, *Eur. J. Agron.* 21 (2004) 465–476.
- [8] U. Anastasi, M. Cammarata, V. Abbate, Yield potential and oil quality of sunflower (oleic and standard) grown between autumn and summer, *Ital. J. Agron.* 4 (2000) 23–36.
- [9] J. Browse, Z. Xin, Temperature sensing and cold acclimation, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001) 241–246.
- [10] M. Uemura, R.A. Joseph, P.L. Steponkus, Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions), *Plant Physiol.* 109 (1995) 15–30.
- [11] T.R. Peoples, D.W. Koch, S.C. Smith, Relationship between chloroplast membrane fatty acid composition and photosynthetic response to a chilling temperature in four alfalfa cultivars, *Plant Physiol.* 61 (1978) 472–473.
- [12] Z. Zhi-Hong, S. Li, L. Wei, C. Wei, Z. Ying-Guo, A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Sci.* 168 (2005) 527–534.
- [13] M.J. Fryer, K. Oxborough, B. Martin, D.R. Ort, N.R. Baker, Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature, *Plant Physiol.* 108 (1995) 761–767.
- [14] Q.J. Groom, N.R. Baker, Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter, *Plant Physiol.* 100 (1992) 1217–1223.
- [15] D.H. Greer, G. Öquist, C. Ottander, Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5 °C and 20 °C, *Physiol. Plant.* 81 (1991) 203–210.

- [16] Y. Fracheboud, P. Haldimann, J. Leipner, P. Stamp, Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.), J. Exp. Bot. 50 (1999) 1533–1540.
- [17] C. Jompuk, Y. Fracheboud, P. Stamp, J. Leipner, Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions, J. Exp. Bot. 56 (2005) 1153–1163.
- [18] R.R. Wise, Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light, Photosynth. Res. 45 (1995) 79–97.
- [19] M.J. Verheul, P.R. Van Hassel, P. Stamp, Comparison of maize inbred lines differing in low temperature tolerance: effect of acclimation at suboptimal temperature on chloroplast functioning, Ann. Bot. 76 (1995) 7–14.
- [20] C.L. Guy, Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41 (1990) 187–223.
- [21] K.L. Koster, D.V. Lynch, Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye, Plant Physiol. 98 (1992) 108–113.
- [22] G. Yelenosky, C.L. Guy, Freezing tolerance of citrus, spinach, and petunia leaf tissue: osmotic adjustment and sensitivity to freeze induced cellular dehydration, Plant Physiol. 89 (1989) 444–451.
- [23] A.M. Ismail, A.E. Hall, Variation in traits associated with chilling tolerance during emergence in cowpea germplasm, Field Crop Res. 77 (2002) 99–113.
- [24] P.S. Campos, V. Quartan, J.C. Ramalho, M.A. Nunes, Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants, J. Plant Physiol. 160 (2003) 283–292.
- [25] N.C. Collins, F. Tardieu, R. Tuberosa, Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? Plant Physiol. 147 (2008) 469–486.
- [26] G.R. Al Chaarani, A. Roustae, L. Gentzbittel, L. Mokrani, G. Barrault, G. Dechamps-Guillaume, A. Sarrafi, A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs), Theor. Appl. Genet. 104 (2002) 490–496.
- [27] P.-F. Bert, G. Dechamps-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D.T. de Labrouhe, P. Nicolas, F. Vear, Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.), Theor. Appl. Genet. 109 (2004) 865–874.
- [28] L. Mokrani, L. Gentzbittel, F. Azanza, L. Fitamant, G. Al Chaarani, A. Sarrafi, Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.), Theor. Appl. Genet. 106 (2002) 149–156.
- [29] D. Herve, F. Fabre, E.F. Berrios, N. Leroux, G.A. Chaarani, C. Planchon, A. Sarrafi, L. Gentzbittel, QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions, J. Exp. Bot. 52 (2001) 1857–1864.
- [30] S. Poormohammad Kiani, P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, A. Sarrafi, Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments, Plant Sci. 172 (2007) 773–787.
- [31] Q. Lou, L. Chen, Z. Sun, Y. Xing, J. Li, X. Xu, H. Mei, L. Luo, A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.), Euphytica 158 (2007) 87–94.
- [32] M. Baga, S. Chodaparambil, A. Limin, M. Pecar, D. Fowler, R. Chibbar, Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat, Funct. Integr. Genomics 7 (2007) 53–68.
- [33] Y. Fracheboud, C. Jompuk, J.M. Ribaut, P. Stamp, J. Leipner, Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize, Plant Mol. Biol. 56 (2004) 241–253.
- [34] J. Knoll, N. Gunaratna, G. Ejeta, QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum, Theor. Appl. Genet. 116 (2008) 577–587.
- [35] A.A. Schneider, J.F. Miller, Description of sunflower growth stages, Crop Sci. 21 (1981) 901–903.
- [36] G.H. Krause, Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms, Physiol. Plant. 74 (1988) 566–574.
- [37] P. Dagnelie, Statistique théorique et appliquée, Tome 2: Inférence statistique à une et deux dimensions, De Boeck et Larcier s.a., Département De Boeck université, Paris, Bruxelles, 1998.
- [38] E. Flores Berrios, L. Gentzbittel, H. Kayyal, G. Alibert, A. Sarrafi, AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.), Theor. Appl. Genet. 101 (2000) 1299–1306.
- [39] L. Gentzbittel, F. Vear, Y.X. Zhang, A. Bervillé, P. Nicolas, Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.), Theor. Appl. Genet. 90 (1995) 1079–1086.
- [40] G.R. Al Chaarani, L. Gentzbittel, X.Q. Huang, A. Sarrafi, Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.), TAG Theor. Appl. Genet. 109 (2004) 1353–1360.
- [41] S. Poormohammad Kiani, P. Maury, L. Nouri, P. Grieu, A. Sarrafi, QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments, Plant Breed. (2009), doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01628.x.
- [42] A. Ebrahimi, P. Maury, M. Berger, S. Poormohammad Kiani, A. Nabipour, P. Grieu, A. Sarrafi, QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes, Genome 51 (2008) 599–615.
- [43] C. Basten, B. Weir, Z. Zeng, QTL Cartographer: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping, North Carolina State University, USA, 2007.
- [44] Z.B. Zeng, Precision mapping of quantitative trait loci, Genetics 136 (1994) 1457–1468.
- [45] G.A. Churchill, R.W. Doerge, Empirical threshold values for quantitative trait mapping, Genetics 138 (1994) 963–971.
- [46] S. Poormohammad Kiani, P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel, A. Sarrafi, Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.), Theor. Appl. Genet. 114 (2007) 193–207.
- [47] T. Hewezi, M. Leger, W. El Kayal, L. Gentzbittel, Transcriptional profiling of sunflower plants growing under low temperatures reveals an extensive down-regulation of gene expression associated with chilling sensitivity, J. Exp. Bot. 57 (2006) 3109–3122.
- [48] H. Van Buskirk, M. Thomashow, *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation, Physiol. Plant. 126 (2006) 72–80.
- [49] A.H. Kingston-Smith, J. Harbinson, J. Williams, C.H. Foyer, Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves, Plant Physiol. 114 (1997) 1039–1046.
- [50] B.A. Moll, K.E. Steinback, Chilling sensitivity in *Oryza sativa*: the role of protein phosphorylation in protection against photoinhibition, Plant Physiol. 80 (1986) 420–423.
- [51] B. Demmig-Adams, W.W. Adams III, The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, Trends Plant Sci. 1 (1996) 21–26.
- [52] P. Haldimann, Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity, Plant Cell Environ. 21 (1998) 200–208.
- [53] J. Leipner, Y. Fracheboud, P. Stamp, Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance, Environ. Exp. Bot. 42 (1999) 129–139.
- [54] A. Hund, Y. Fracheboud, A. Soldati, E. Frascaroli, S. Salvi, P. Stamp, QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress, Theor. Appl. Genet. 109 (2004) 618–629.
- [55] A. Hund, E. Frascaroli, J. Leipner, C. Jompuk, P. Stamp, Y. Fracheboud, Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings, Mol. Breed. 16 (2005) 321–331.
- [56] M.J. Verheul, C. Picatto, P. Stamp, Growth and development of maize (*Zea mays* L.) seedlings under chilling conditions in the field, Eur. J. Agron. 5 (1996) 31–43.
- [57] M. Hekneby, M.C. Antolín, M. Sánchez-Díaz, Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes, Environ. Exp. Bot. 55 (2006) 305–314.
- [58] D.J. Allen, D.R. Ort, Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants, Trends Plant Sci. 6 (2001) 36–42.
- [59] M.P. Guinchard, C. Robin, P. Grieu, A. Guckert, Cold acclimation in white clover subjected to chilling and frost: changes in water and carbohydrates status, Eur. J. Agron. 6 (1997) 225–233.
- [60] K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki, Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants, Physiol. Plant. 126 (2006) 62–71.

4.2.6 Conclusion

Au sein de la population de LIRs étudiée, nos résultats ont révélé une variabilité génétique significative pour tous les caractères agro-morphologiques et physiologiques étudiés en conditions de basses températures induites par des semis précoces. Certains caractères, comme le temps thermique nécessaire pour atteindre la floraison, la production de biomasse et la surface foliaire à la floraison, l'efficacité du photosystème II et le taux de chlorophylle présentent des différences significatives entre les moyennes des LIRs en condition de basses températures et également en condition contrôle. En revanche, d'autres caractères comme la stabilité des membranes plasmiques, la surface foliaire spécifique et le potentiel osmotique expriment une variabilité génétique significative seulement dans des conditions de basses températures. Parmi l'ensemble des caractères étudiés, trois présentent un gain génétique significatif aux basses températures et peuvent être améliorés par des méthodes de sélection classique : la vitesse moyenne d'élongation de l'hypocotyle, la surface foliaire à la floraison et le potentiel osmotique.

La variabilité génétique observée sur cette population de LIRs cartographiée a permis d'identifier des régions génomiques (QTLs) impliquées dans le contrôle génétique des caractères étudiés. Des QTLs « spécifiques » aux conditions de basses températures ont été détectés, ainsi que des QTLs « non spécifiques » contrôlant les caractères dans l'ensemble des conditions étudiées. Ainsi nous avons montré que les paramètres relatifs à la levée à basse température, comme les vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle, sont sous le contrôle de QTLs à effets forts, ce qui représente un avantage pour la sélection. L'un de ces QTLs à effet fort est par ailleurs associé à un marqueur SSR (*ORS1128*). Le temps thermique nécessaire pour atteindre la floraison est sous le contrôle génétique d'un grand nombre de régions génomiques présentant chacune un effet modéré sur le caractère. Ce trait est génétiquement lié avec les paramètres relatifs à la levée à basse température comme le montre les deux régions génomiques situées sur les groupes de liaison 4 et 14 où des QTLs identifiés pour les paramètres relatifs aux vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle sont co-localisés avec des QTLs détectés pour le temps thermique nécessaire pour atteindre la floraison en conditions de semis précoce. Dans ces deux cas, les QTLs concernés sont des QTLs à effets forts : sur le groupe de liaison 4, les QTLs *b1-G-4.1*, *b0-G-4.1* et *GDDF-ES-A.4.1* expliquent respectivement 23%, 22% et 15% de la variance phénotypique observée pour chacun de ces caractères, et sur le groupe de liaison 14 les QTLs *TB-El-14.1*, *b1-El-14.1* et *GDDF-ES-A-14.1* expliquent respectivement 40%, 23% et 14% de la variance phénotypique

observée pour chacun de ces caractères. Les signes des valeurs de l'additivité pour ces QTLs montrent que le parent le plus précoce pour atteindre la floraison (RHA266) est celui qui apporte également les allèles favorables pour la vitesse potentielle de germination à zéro degré et la vitesse de croissance de l'hypocotyle. Ce résultat suggère que dans le cas de semis précoces, le temps thermique du semis à la floraison est fortement influencé par les vitesses de germinations et d'élongation de l'hypocotyle qui déterminent la vitesse de levée. Ces deux régions génomiques constituent des régions d'intérêt pour la levée et la durée du cycle jusqu'à la floraison. Le marqueur SSR (*ORS1128*) associé aux QTLs *TB-El-14.1*, *b1-El-14.1* et *GDDF-ES-A-14.1* est un marqueur d'intérêt pour la sélection de ces traits. Le rôle de ces deux régions génomiques dans le contrôle de la levée au champ à basse température devra être confirmé par une analyse spécifique pour ce caractère.

Des QTLs contrôlant le temps thermique pour atteindre la floraison sont co-localisés avec des QTLs de la production de biomasse en condition de semis précoces sur les groupes de liaison 1 (*GDDF-ES-F.1.1* et *PDW-S2-1.1*) et 10 (*GDDF-ES-A.10.2* et *PDW-S2-10.1*). Le même phénomène est observé en condition de semis conventionnels sur les groupes de liaison 5 (*GDDF-TS-A.5.1* et *PDW-S3-5.1*) et 8 (*GDDF-TS-F.8.1* et *DW-TS- 8.2*, *GDDF-TS-F.8.2* et *DW-TS- 8.3*). Des QTLs contrôlant des traits physiologiques relatifs du fonctionnement photosynthétique co-localisent également avec des QTLs de précocité à floraison sur les groupes de liaison 2 (*GDDF-ES-A.2.1*, *GDDF-TS-A.2.1*, *CC-S2-2.1* et *CC-S3-2.1*), 10 (*GDDF-ES-A.10.1*, *CC-S2-10.1* et *Fv/Fm-S1-10.1*) et 14 (*GDDF-ES-A.14.1*, *GDDF-ES-F.14.1* et *CC-S2-14.1*). Les signes des valeurs d'additivité des ces QTLs co-localisés indique qu'une floraison tardive est associée génétiquement à une capacité photosynthétique élevée à basse température et à une forte accumulation de biomasse. Ces résultats montrent que la sélection de génotypes d'intérêt, présentant un cycle tardif et une forte accumulation de biomasse liée à une capacité photosynthétique élevée, peut être réalisée.

La tolérance au froid chez le tournesol peut également être améliorée grâce au marqueur SSR (*ORS331_2*), celui-ci étant liée à un QTL à effet majeur contrôlant le REL, paramètre indicateur de la stabilité des membranes plasmiques à basses températures. Les QTLs identifiés spécifiquement dans des conditions de basses températures devront être validés, dans d'autres scénarios de basses températures et dans d'autres fonds génétiques, avant que les marqueurs d'intérêt associés à ces QTLs puissent être utilisés dans des programmes de sélection de tournesol.

5 CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de la recherche de pratiques agricoles innovantes pour répondre aux enjeux liés au développement d'une agriculture durable, nous nous sommes intéressés au semis précoce du tournesol, stratégie culturale permettant « d'esquiver » la sécheresse. Cette conduite de culture induit, dans nos régions tempérées, une baisse significative de la température au moment du semis et pendant les premiers stades de la croissance végétative. La mise en œuvre de cette conduite culturale et son évaluation, en termes de gain « écologique » (conservation des ressources en eau en évitant l'irrigation) et de productivité (rendement) repose sur l'utilisation de variétés spécifiquement adaptées aux basses températures. Ainsi, les objectifs de ce travail ont consisté à identifier des génotypes de tournesol adaptés à des conditions de semis précoce associés à des basses températures en début de cycle, et à fournir des outils pour la sélection de ces idéotypes. Pour cela, nous avons mis en œuvre une démarche associant l'agronomie, la modélisation, l'écophysiologie et la génétique.

Ainsi, nous avons dans un premier temps évalué le modèle de culture SUNFLO pour des semis précoces (dans les conditions climatiques du sud ouest de la France) puis identifié par simulation un idéotype permettant de valoriser au mieux les ressources en eau au cours du cycle de développement permettant ainsi d'optimiser le potentiel de production pour ce type de conduite. Les caractéristiques de cet idéotype se sont traduites principalement en termes de développement phénologique, au niveau de la longueur du cycle de développement pour les phases de croissance hétérotrophique et végétative. Dans un deuxième temps, les processus relatifs à la croissance et au développement à basses températures ont été analysés sur un grand nombre de génotypes afin d'évaluer le contrôle génétique de traits agromorphologiques et physiologiques associés à la tolérance au froid. L'élaboration de modèles écophysiologiques, en particulier pour des processus clés de l'interaction génotype x environnement en conditions de semis précoce (germination et croissance de l'hypocotyle), a permis d'identifier des paramètres génotypiques caractérisant les réponses des génotypes aux basses températures.. La variabilité génétique qui s'est exprimée pour les caractères étudiés a permis de reclasser dans le modèle SUNFLO certains paramètres considérés comme constant quel que soit le génotype (paramètres « non génotypiques ») en paramètres « génotypiques » c'est-à-dire variable selon les génotypes. Cela a permis d'améliorer la qualité prédictive du modèle. La proposition de nouveaux formalismes dans le modèle SUNFLO, par exemple pour le processus de germination, pourrait aussi contribuer à mieux représenter les interactions GxE. L'analyse génétique réalisée sur les traits agro-morphologiques et physiologiques a

également permis d'identifier des marqueurs SSR associés à des QTLs d'intérêt pour la sélection de génotypes tolérants aux basses températures.

Yin *et al.* (2003) ont proposé une démarche originale, dans laquelle génétique et modèle de culture jouent des rôles complémentaires pour l'amélioration variétale. Dans leur cas, la détection de QTLs se fait sur les paramètres génotypiques d'entrée du modèle, dans un environnement donné. L'analyse génétique réalisée sur ces traits permet de révéler les interactions GxE et de les prendre en compte dans le modèle de culture qui pourra alors servir à définir un idéotype spécifique de l'environnement étudié. Dans notre cas, l'idéotype variétal est déterminé au départ par le modèle de culture, et la détection de QTLs se fait sur les variables de sortie du modèle préalablement caractérisées et validées comme caractères d'intérêt grâce aux travaux menés en écophysiologie. Cette différence entre notre approche et celle de Yin *et al.* vient du fait que le modèle utilisé dans notre étude (SUNFLO) est capable de prendre en compte la variabilité génétique qui s'exprime dans différents environnements et donc de représenter les interactions GxE (Casadebaig, 2008).

L'association de modèles écophysiologiques et de la génétique a également été proposée selon deux approches. Soit en recherchant des QTLs sur des paramètres de sortie de modèles (courbes de réponses), et non pas sur les caractères mesurés (Reymond *et al.*, 2003; Reymond *et al.*, 2004). Nous avons procédé de la même manière en recherchant les QTLs impliqués dans la réponse des vitesses de germination et d'élongation de l'hypocotyle aux basses températures. Soit en créant des modèles écophysiologiques basés sur des valeurs génotypiques (combinaison allélique des marqueurs pour les QTLs d'intérêts) comme cela a été réalisé pour prédire le rendement chez le blé (Yin *et al.*, 2000) ou l'élongation foliaire chez le maïs (Tardieu *et al.*, 2005). Ces modèles qui établissent le lien entre le phénotype et le génotype par le biais des QTLs, ont montré qu'il était possible de prédire la valeur d'un caractère d'après un modèle construit en se basant non pas sur la variabilité phénotypique du caractère dans des environnements différents mais sur la variabilité génotypique (Tardieu *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2000). Notre travail, tel qu'il a été défini devrait permettre de développer cette démarche en déterminant les paramètres génotypiques du modèle SUNFLO à partir du génotype (allèles aux marqueurs) et non pas uniquement sur des valeurs phénotypiques.

Au final un certain nombre de résultats importants dans le cadre de notre étude a pu être établi. Le modèle SUNFLO a été utilisé pour simuler des conditions de semis précoces pour

plusieurs types de variétés virtuelles sur un grand nombre de séries climatiques. Les résultats de cette évaluation ont confirmé que le semis précoce est une stratégie efficace pour esquiver les sécheresses estivales qui limitent la production, quantitativement et qualitativement, et doit donc permettre d'augmenter le rendement. L'idéotype identifié comme celui valorisant le mieux les conditions de semis précoce présente les caractéristiques phénologiques suivantes : levée précoce et cycle de développement tardif. Une croissance optimale de cet idéotype dans ces conditions limitées par les basses températures nécessite de plus qu'il soit tolérant au froid.

Nos résultats ont révélé un réel potentiel pour la sélection d'un tel idéotype. La variabilité génétique qui s'est exprimée au sein de la population de LIRs issue du croisement entre « RHA266 » et « PAC2 » étudiée à basses températures pour les paramètres relatifs à la levée montre qu'il est possible de sélectionner des génotypes qui nécessitent peu de temps thermique pour lever, c'est-à-dire qui sont capables de germer rapidement à basses températures et qui possèdent une température de base de croissance de l'hypocotyle proche de zéro degré. Parmi ces deux caractères, c'est la croissance de l'hypocotyle qui présente le meilleur potentiel de réponse à la sélection. De plus, l'étude de l'architecture génétique de ces deux caractères, dont dépend la durée de la levée à basse température, a révélé qu'ils sont contrôlés de façon indépendante chacun par un petit nombre de QTLs à effets forts, ce qui présente un avantage pour la sélection.

La sélection de génotypes associant les caractéristiques d'un cycle tardif et d'une bonne tolérance au froid favorisant la croissance à basse température est possible, même si aucune corrélation phénotypique n'a été établie entre la durée du cycle végétatif et les indicateurs physiologiques impliqués dans la tolérance au froid. Nous avons détecté des régions chromosomiques spécifiques de la durée de la phase végétative en conditions de semis précoces et également des traits physiologiques impliqués dans la réponse au froid chez le tournesol. La teneur en chlorophylle, avec le potentiel osmotique et le maintien de la stabilité des membranes, sont les trois principaux traits physiologiques qui contribuent à assurer la tolérance au froid. L'analyse génétique a mis en évidence quelques marqueurs moléculaires associés à des QTLs d'intérêt en semis précoce détectés pour ces traits physiologiques, notamment les marqueurs SSR (*ORS331_2*) associé à un QTL à effet majeur pour la stabilité des membranes, (*ORS1040*) associé à un QTL à effet majeur pour la teneur en chlorophylle, et les marqueurs (*ORS1144*) et (*ORS1146*) associés à des QTLs identifiés pour le potentiel osmotique. L'utilisation de ces marqueurs dans des programmes de sélection assistée par

marqueurs nécessiterait au préalable une validation de ces QTLs dans un plus grand nombre d'environnements ou dans d'autres fonds génétiques afin de valider les QTLs constitutifs et les QTLs spécifiques aux environnements (Collins *et al.*, 2008).

Certaines perspectives d'ordre génomiques sont envisageables à partir de notre étude. L'analyse du transcriptome a déjà été étudiée chez le tournesol à basse température en utilisant une puce à ADN et a révélé que 108 gènes étaient impliqués dans la réponse aux basses températures (Hewezi *et al.*, 2006). Il serait intéressant de compléter cette étude en analysant l'expression de gènes de façon plus ciblée en réalisant des RT-PCR (real-time PCR) quantitative. Soit à partir de quelques génotypes choisis pour avoir des réponses physiologiques contrastées à basses températures, et des deux parents «RHA266 » et PAC2 ». Cela permettrait de corrélérer le niveau d'expression des gènes aux différences phénotypiques relatives aux caractères de tolérance au froid. Soit sur toutes les lignées recombinantes (RILs) issues du croisement de « PAC2 » et de « RHA266 » pour identifier les QTL contrôlant l'expression de gène (eQTL). Cette deuxième approche a pour but de localiser les QTLs impliqués dans l'expression différentielle globale des gènes et ainsi de pouvoir associer la variation phénotypique à la variation transcriptomique.

L'analyse génétique de l'ensemble des caractères agro-morphologiques et physiologiques étudiés a également permis de caractériser la variabilité génétique qui s'exprime pour ces caractères en conditions de semis précoce. Certains caractères, correspondant à des paramètres non génotypiques dans le modèle SUNFLO, se sont révélés variables dans la population de LIRs sous des contraintes de basses températures, comme le temps de levée, ou l'efficacité biologique. Il serait alors envisageable de mieux caractériser cette variabilité génétique afin de transformer certains paramètres du modèle considérés comme non génotypiques en paramètres génotypiques. Ces modifications devraient permettre d'améliorer la qualité prédictive du modèle pour des conditions de semis précoce et ainsi d'étendre encore son domaine de validité. Pourquoi ne pas envisager de pouvoir simuler des semis de début d'hiver (alors que notre étude s'est plutôt intéressée au semis de fin d'hiver)? Cette pratique culturale, testée en climat méditerranéen, a en effet révélé un fort potentiel de production chez le tournesol (Gimeno *et al.*, 1985; Hadjichristodoulou, 1987; Tenreiro *et al.*, 1994).

En avançant la date de semis d'un à deux mois par rapport à la date conventionnelle, nous nous situons en fin d'hiver. La pratique culturale du semis en début d'hiver constitue l'une des perspectives possibles de notre étude. Mais avant d'élargir notre travail à des conditions encore plus éloignées des conditions de semis traditionnelles, plusieurs questions doivent tout

d'abord être résolues. La première, d'ordre physiologique, concerne la tolérance au gel. Nous avons montré que le tournesol pouvait supporter des températures proches de zéro degré, et présentait un potentiel d'acclimatation aux basses températures, mais nous nous sommes limités à l'étude des températures basses positives. La tolérance au gel n'implique pas les mêmes mécanismes physiologiques de réponse que la tolérance aux basses températures (Pearce, 1999). La survie de la culture à un « coup de gel », comme il y en a souvent dans le Sud-Ouest de la France jusqu'en Mars, mais aussi à des périodes de températures négatives prolongées, est primordiale pour l'implantation d'un semis précoce. Le potentiel de résistance au gel chez le tournesol doit donc être exploré. La seconde concerne les effets éventuels de la photopériode. Une avancée de plus de deux mois peut, comme l'a montré Goyne (1989), avoir des conséquences en terme de photopériode qui, associée à des températures basses, modifie le développement de la culture. L'amélioration du modèle de culture SUNFLO devra tenir compte de ces nouvelles contraintes physiologiques et être capable de prendre en compte les températures négatives et l'effet de la photopériode. L'amélioration de la capacité de prédiction du modèle pour les semis précoces doit aussi se faire dans la représentation des peuplements irréguliers et de faibles densités. Il est également souhaitable d'améliorer la représentation de la phase semis-levée dans le modèle, à travers la prise en compte des propriétés physiques du sol (structure, taille et répartition des agrégats) et de leurs interactions avec le processus d'élongation de l'hypocotyle (force d'émergence). Enfin, une base génétique plus large que celles étudiées jusqu'à maintenant chez le tournesol, en terme de réponse aux basses températures et à la photopériode, devraient être explorées. Certaines espèces de tournesols sauvages représentent d'ailleurs un réservoir de gènes important pour la recherche de nouveaux caractères d'intérêt agronomiques non exploités jusqu'à maintenant (Burke *et al.*, 2002 (b); Faure *et al.*, 2002).

Elargir la base génétique du tournesol cultivé devrait permettre de trouver de nouvelles variétés de tournesol capables de s'adapter à d'autres contraintes environnementales. Cette faculté s'avère essentielle si l'on tient compte du changement climatique annoncé qui dans la région tendrait à rendre les hivers plus doux et humides et les étés encore plus chauds et secs. Dans ce contexte, les approches associant plusieurs disciplines permettant la mise au point et l'élaboration de stratégies innovantes pour améliorer la productivité du tournesol devront être d'avantage explorées.

6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam N.R., Dierig D.A., Coffelt T.A., Wintermeyer M.J., Mackey B.E., et Wall G.W., 2007: Cardinal temperatures for germination and early growth of two *Lesquerella* species. *Industrial Crops and Products* 25, 24-33.
- Agüera F., Villalobos J.F., et Orgaz F., 1997: Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus*, L.) genotypes differing in early vigour using a simulation model. *European Journal of Agronomy* 109-118.
- Aiken R.M., 2005: Applying thermal time scales to sunflower development. *Agronomy Journal* 97, 746-754.
- Al Chaarani G.R., Gentzbittel L., Huang X.Q., et Sarrafi A., 2004: Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1353-1360.
- Al Chaarani G.R., Roustae A., Gentzbittel L., Mokrani L., Barrault G., Dechamp-Guillaume G., et Sarrafi A., 2002: A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490-496.
- Allen D.J. et Ort D.R., 2001: Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6, 36-42.
- Allinne C., 2006: Vigueur à la levée et croissance de génotypes de tournesol en conditions froides: Approche fonctionnelle et analyse génétique. *Mémoire de Master, Université de Toulouse III, INPT-ENSAT*.
- Alvarado V. et Bradford K.J., 2002: A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. *Plant, Cell & Environment* 25, 1061-1069.
- Andaya V. et Tai T., 2006: Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 467-475.
- Angus J.F., Cunningham R.B., Moncur M.W., et Mackenzie D.H., 1980: Phasic development in field crops I. Thermal response in the seedling phase. *Field Crops Research* 3, 365-378.

Bacon R.K., Cantrell R.P., et Axtell J.D., 1986: Selection for seedling cold tolerance in grain sorghum. *Crop Science* 26, 900-903.

Barros J.F.C., de Carvalho M., et Basch G., 2004: Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 21, 347-356.

Basten C., Weir B., et Zeng Z., 2007: QTL Cartographer: a reference manual and tutorial for QTL mapping. *North Carolina State University, USA*,

Benech-Arnold R.L. et Sanchez R.A., 1995: Modeling weed seed germination. In: "Seed development and germination". eds J.Kigel and G.Galili 545-566.

Bewley D. et Black M., 1994: Seeds: physiology of development and germination. *Second Edition. Plenum Press, New York, London*

Blacklow W.M., 1972: Influence of temperature on germination and elongation of the radicle and shoot of corn (*Zea mays* L.). *Crop Science* 12, 647-650.

Bockstaller C., Galan M.B., Capitaine M., Colomb B., Mousset J., et Viaux P., 2008: Comment évaluer la durabilité des systèmes en production végétale ? in : Systèmes de culture innovants et durables, Quelles méthodes pour les mettre au point et les évaluer ?, in: "Des systèmes de culture innovants et durables : quelles méthodes pour les mettre au point et les évaluer ?". Reau R., Doré T.(eds), Editions Educagri 28-51.

Brisson N., Gary C., Justes E., Roche R., Mary B., Ripoche D., Zimmer D., Sierra J., Bertuzzi P., Burger P., BussiFre F., Cabidoche Y.M., Cellier P., Debaeke P., GaudillFre J.P., Hqnault C., Maraux F., Seguin B., et Sinoquet H., 2003: An overview of the crop model. *European Journal of Agronomy* 18, 309-332.

Brunel S., Teulat-Merah B., Wagner M.H., Huguet T., Prosperi J.M., et Durr C., 2009: Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*. *Annals of Botany* 103, 1103-1117.

Burke J.M., Tang S., Knapp S.J., et Rieseberg L.H., 2002 (a): Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161, 1257-1267.

Burke J.M., Gardner K.A., et Rieseberg L.H., 2002 (b): The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *American Journal of Botany* 89, 1550-1552.

- Cabelguenne M., Debaeke P., et Bouniols A., 1999: EPICphase, a version of the EPIC model simulating the effects of water and nitrogen stress on biomass and yield, taking account of developmental stages: validation on maize, sunflower, sorghum, soybean and winter wheat. *Agricultural Systems* 60, 175-196.
- Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.c., et Nunes M.A., 2003: Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160, 283-292.
- Casadebaig P., 2004: Analyse de la variabilité génétique de l'architecture du tournesol : Conséquences sur l'interception du rayonnement de la floraison à la maturité. *Mémoire de DEA, Université de Montpellier II, ENSA-M*.
- Casadebaig P., 2008: analyse et modélisation des interactions génotypes-environnement-conduite de culture: application au tournesol (*helianthus annuus*). *thèse de doctorat* 195pp-
- Casadebaig P., Debaeke P., et Lecoœur J., 2008: Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy* 28, 646-654.
- CETIOM, 2002: Tournesol : les techniques culturales, le contexte économique. *Grignon, ed.CETIOM* 37pp-
- Chapman S.C., Hammer G.L., et Meinke H., 1993: A sunflower simulation model: I. model development. *Agronomy Journal* 85, 725-735.
- Collins N.C., Tardieu F., et Tuberosa R., 2008: Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiology* 147, 469-486.
- Come D., 1992: Les végétaux et le froid. *Hermann,ed* 597pp-
- Côme D. et Corbineau F., 1998: Physiologie végétale, tome 2, croissance et développement, chapitre 2: Semences et germination. *Hermann; Édition : Nouvelle édition* 185-313.
- Debaeke P., Lecoœur J., Triboï A.M., et Vear F., 2003: Productivité du tournesol: analyse de la variabilité génétique obtenue par 30 année de sélection variétale en France. *Tech.rep., INRA-AMSOL, Paris, France* 23, 82-
- Debaeke P. et Amigues J.P., 2008: Face à la sécheresse et à la pénurie d'eau, quelles mesures pour ajuster la demande agricole à l'offre de ressource en eau ? 911. *La Houille Blanche* 3, 74-81.

- Debaeke P. et Bertrand M., 2008: Évaluation des impacts de la sécheresse sur le rendement des grandes cultures en France 912. *Cahiers Agricultures* 17, 437-443.
- Dekkers J.C.M. et Hospital F., 2002: The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet* 3, 22-32.
- Demmig-Adams B. et Adams III W.W., 1996: The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21-26.
- Durr C., Aubertot J.N., Richard G., Dubrulle P., Duval Y., et Boiffin J., 2001: Simple: A model for simulation of plant emergence predicting the effects of soil tillage and sowing operations. *Soil Science Society of America Journal* 65, 414-423.
- Ebrahimi A., Maury P., Grieu P., et Sarrafi A., 2009: Genetic variability and QTL mapping for seed germination parameters under drought stress in sunflower. *Plant Breeding* (in press),
- Ebrahimi A., Maury P., Berger M., Poormohammad Kiani S., Nabipour A., Grieu P., et Sarrafi A., 2008: QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome* 51, 599-615.
- Falconer D.S. et Mackay T.F.C., 1996: Introduction to Quantitative Genetics. 4rd edn. Longman, Harlow.
- Faure N., Serieys H., et Bervillq A., 2002: Potential gene flow from cultivated sunflower to volunteer, wild *Helianthus* species in Europe. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 89, 183-190.
- Flagella Z., Rotunno T., Tarantino E., Di Caterina R., et De Caro A., 2002: Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *European Journal of Agronomy* 17, 221-230.
- Flores Berrios E., Gentzbittel L., Kayyal H., Alibert G., et Sarrafi A., 2000: AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101, 1299-1306.
- Fonts C., Andrade F.H., Grondona M., Hall A., et Leon A.J., 2008: Phenological characterization of near-isogenic sunflower families bearing two QTLs for photoperiodic response. *Crop Science* 48, 1579-1585.

- Fracheboud Y., Jompuk C., Ribaut J.M., Stamp P., et Leipner J., 2004: Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology* 56, 241-253.
- Fryer M.J., Oxborough K., Martin B., Ort D.R., et Baker N.R., 1995: Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiology* 108, 761-767.
- Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A., et Baker N.R., 1998: Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116, 571-580.
- Fujino K., 2004: A major gene for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 136, 63-68.
- Garcés R., Sarmiento C., et Mancha M., 1992: Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta* 186, 461-465.
- Gentzbittel L., Vear F., Zhang Y.X., Bervillé A., et Nicolas P., 1995: Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 90, 1079-1086.
- Gimeno V., Fernandez-Martinez J., et Fereres E., 1985: Sunflower response to winter plantings in a mediterranean environment. *Helia* 8, 63-67.
- Gimeno V., Fernandez-Martinez J., et Fereres E., 1989: Winter planting as a means of drought escape in sunflower. *Field Crops Research* 22, 307-316.
- Gombos Z., Wada H., et Murata N., 1994: The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8787-8791.
- Gouallec J.L., Cornic G., et Briantais J.M., 1991: Chlorophyll fluorescence and photoinhibition in a tropical rainforest understory plant. *Photosynthesis Research* 27, 135-142.
- Goyne P.J. et Schneiter A.A., 1987: Photoperiod influence on development in sunflower genotypes. *Agronomy Journal* 79, 704-709.

- Goyne P.J. et Schneiter A.A., 1988: Temperature and photoperiod interactions with the phenological development of sunflower. *Agronomy Journal* 80, 777-784.
- Goyne P.J. et Schneiter A.A., 1989: Sunflower genotype response to photoperiod and temperature in field environments. *Agronomy Journal* 81, 826-831.
- Goyne P.J. et Schneiter A.A., 1990: Prediction of time to anthesis of a selection of sunflower genotypes. *Agronomy Journal* 82, 501-505.
- Granier C. et Tardieu F., 1998: Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? *Plant, Cell & Environment* 21, 695-703.
- Groom Q.J. et Baker N.R., 1992: Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. *Plant Physiology* 100, 1217-1223.
- Guinchard M.P., Robin C., Grieu P., et Guckert A., 1997: Cold acclimation in white clover subjected to chilling and frost: Changes in water and carbohydrates status. *European Journal of Agronomy* 6, 225-233.
- Hadjichristodoulou A., 1987: Trials with winter-sown sunflower. *Helia* 10, 57-61.
- Hatfield J.L. et Egli D.B., 1974: Effect of temperature on the rate of soybean hypocotyl elongation and field emergence. *Crop Science* 14, 423-426.
- Hekneby M., Antolín M.C., et Sánchez-Díaz M., 2006: Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany* 55, 305-314.
- Herve D., Fabre F., Berrios E.F., Leroux N., Chaarani G.A., Planchon C., Sarrafi A., et Gentzbittel L., 2001: QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus L.*) under greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany* 52, 1857-1864.
- Hewezi T., Leger M., El Kayal W., Gentzbittel L., 2006: Transcriptional profiling of sunflower plants growing under low temperatures reveals an extensive down regulation of gene expression associated with chilling sensitivity. *Journal of Experimental Botany* 57, 3109-3122.
- Horie T., 1977: Simulation of sunower growth : I. Formulation and parameterisation of dry matter production, leaf photosynthesis, respiration and partitioning of photosynthesis. *Bull.Natl.Inst.Agric.Sci.(Japan.) Ser.A* 24, 45-70.

- Hund A., Fracheboud Y., Soldati A., Frascaroli E., Salvi S., et Stamp P., 2004: QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 618-629.
- Hund A., Frascaroli E., Leipner J., Jompuk C., Stamp P., et Fracheboud Y., 2005: Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings. *Molecular Breeding* 16, 321-331.
- Hurry V.M., Strand A., Tobiaeson M., Gardestrom P., et Oquist G., 1995: Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiology* 109, 697-706.
- Janowiak F., Luck E., et Dörffling K., 2003: Chilling tolerance of Maize seedling in the field during cold periods in spring is related to chilling-induced increase in abscisic acid level. *journal agronomy and crop science* 189, 156-161.
- Jeuffroy M.H., Bergez J.E., David C., Flénet F., Gate P., Loyce C., Maupas F., Meynard J.M., Reau R., et Surleau-Chambenoit C., 2008: Utilisation des modèles pour l'aide à la conception et à l'évaluation d'innovations techniques en production végétale : bilan et perspectives, in : "Des systèmes de culture innovants et durables : quelles méthodes pour les mettre au point et les évaluer?". Reau R., Doré T.(eds), Editions Educagri, 109-128 109-128.
- Jompuk C., Fracheboud Y., Stamp P., et Leipner J., 2005: Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays L.*) seedlings grown under field conditions. *Journal of Experimental Botany* 56, 1153-1163.
- Jones O.R., 1984: Yield, water-use efficiency, and oil concentration and quality of dryland sunflower grown in the southern high plains. *Agronomy Journal* 76, 229-235.
- Kacperska A., 2004: Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *physiologia plantarum* 122, 168-
- Knoll J. et Ejeta G., 2008: Marker-assisted selection for early-season cold tolerance in sorghum: QTL validation across populations and environments. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 541-553.
- Knoll J., Gunaratna N., et Ejeta G., 2008: QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 577-587.

Koster K.L. et Lynch D.V., 1992: Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold Acclimation of Puma Rye. *Plant Physiology* 98, 108-113.

Krause G.H., 1988: Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *physiologia plantarum* 74, 566-574.

Lecoeur J. et Guillioni L., 2005: Acquisition du carbone à l'échelle du peuplement. *Agrophysiologie du pois protéagineux.Fonctionnement d'un peuplement de pois et composantes du rendement*. INRA, AVALIS-institut du végétal, UNIP et ENSAM (éd), 65-80.

Lee E.A., Staebler M.A., et Tollenaar M., 2002: Genetic variation in physiological discriminators for cold tolerance-early autotrophic phase of maize development. *Crop Science* 42, 1919-1929.

Leipner J., Jompuk C., Camp K.H., Stamp P., et Fracheboud Y., 2008: QTL studies reveal little relevance of chilling-related seedling traits for yield in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 555-562.

Leipner J., Fracheboud Y., et Stamp P., 1999: Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 42, 129-139.

Lejeune-Hénaut I., Delbreil B., Devaux R., et Gulioni, 2005: Températures froides et fonctionnement d'un couvert de pois. *Agrophysiologie du pois protéagineux.Fonctionnement d'un peuplement de pois et composantes du rendement*. INRA, AVALIS-institut du végétal, UNIP et ENSAM (éd), 184-195.

Leon A.J., Andrade F.H., et Lee M., 2000: Genetic mapping of factors affecting quantitative variation for flowering in sunflower. *Crop Science* 40, 404-407.

Leon A.J., Lee M., et Andrade F.H., 2001: Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in Sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theoretical and Applied Genetics* 102, 497-503.

Lou Q., Chen L., Sun Z., Xing Y., Li J., Xu X., Mei H., et Luo L., 2007: A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa L.*). *Euphytica* 158, 87-94.

- Marshall B. et Squire G.R., 1996: Non-linearity in rate-temperature relations of germination in oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 47, 1369-1375.
- Meinke H., Hammer G.L., et Chapman S.C., 1993: A sunflower simulation model: II. simulating production risks in a variable sub-tropical environment. *Agronomy Journal* 85, 735-742.
- Merrien A., 1992: Les points techniques du CETIOM: physiologie du tournesol. *Ed.CETIOM* 66pp,
- Mestries E., Gentzbittel L., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., et Vear F., 1998: Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to shape *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (shape *Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding* 4, 215-226.
- Meynard J.M., 2008: Produire autrement : réinventer les systèmes de culture. In « Des systèmes de culture innovants et durables : quelles méthodes pour les mettre au point et les évaluer ? ». *Reau R., Doré T.(eds), Editions Educagri*, 11-27.
- Mock J.J. et Bakri A.A., 1976: Recurrent selection for cold tolerance in maize. *Crop Science* 16, 230-233.
- Mock J.J. et McNeill M.J., 1979: Cold tolerance of maize inbred lines adapted to various latitudes in north America. *Crop Science* 19, 239-242.
- Mokrani L., Gentzbittel L., Azanza F., Fitamant L., Al Chaarani, et Sarrafi, 2002: Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106, 149-156.
- Moll B.A. et Steinback K.E., 1986: Chilling Sensitivity in *Oryza sativa*: The Role of Protein Phosphorylation in Protection against Photoinhibition. *Plant Physiology* 80, 420-423.
- Monsi M.A.S.A. et Saeki T.O.S.H., 2005: On the factor light in plant communities and its importance for matter production. *Annals of Botany* 95, 549-567.
- Montané M.H., Petzold B., et Kloppstech K., 1999: Formation of early-light-inducible-protein complexes and status of xanthophyll levels under high light and cold stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 208, 519-527.

- Monteith J.L., 1972: Solar Radiation and Productivity in Tropical Ecosystems. *Journal of Applied Ecology* 9, 747-766.
- Monteith J.L., 1977: Climate and Efficiency of Crop Production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 281, 277-294.
- Monteith J.L., 1996: The Quest for Balance in Crop Modeling. *Agronomy Journal* 88, 695-697.
- Moot D.J., Scott W.R., Roy A.M., et Nicholls A.C., 2000: Base temperature and thermal time requirements for germination and emergence of temperate pasture species. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 43, 15-52.
- Murata N. et Los D.A., 1997: Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiology* 115, 875-879.
- Niyogi K.K., 1999: Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 333-359.
- Nunes M.E. et Smith G.R., 2003: Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science* 43, 1349-1357.
- Orgaz F., Giménez C., Villalobos F.J., et Ferreres E.F., 1992: Radiation use efficiency of sunflower genotypes. In *Proc. 13th Int. Sunflower Conference, Pisa, Italy. 7-11 Sept. 1992*. 268-273.
- Pearce R.S., 1999: Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29, 47-76.
- Pereyra-Irujo G.A. et Aguirrezábal L.A.N., 2007: Sunflower yield and oil quality interactions and variability: Analysis through a simple simulation model. *Agricultural and Forest Meteorology* 143, 252-265.
- Pilorgé E., Arjaure G., et Adam C., 2004: guide de l'expérimentateur tournesol. *CETIOM, ed.*
- Poormohammad Kiani S., Maury P., Ykhlef N., Nouri L., Grieu P., et Sarrafi A., 2009: QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*
- Poormohammad Kiani S., Talia P., Maury P., Grieu P., Heinz R., Perrault A., Nishinakamasu V., Hopp E., Gentzbittel L., Paniego N., et Sarrafi A., 2007a: Genetic analysis of plant water

status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* 172, 773-787.

Poormohammad Kiani S., Grieu P., Maury P., Hewezi T., Gentzbittel L., et Sarrafi A., 2007b: Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114, 193-207.

Pouzet A. et Bugat F., 1985: Description d'une méthode simple et rapide pour l'estimation de la surface foliaire par plante chez le tournesol. In: *Proceedings of the 11th International Sunflower Conference*. ISA, Mar del Plata, Argentina 21-26.

Reymond M., Muller B., Leonardi A., Charcosset A., et Tardieu F., 2003: Combining Quantitative Trait Loci Analysis and an Ecophysiological Model to Analyze the Genetic Variability of the Responses of Maize Leaf Growth to Temperature and Water Deficit. *Plant Physiology* 131, 664-675.

Reymond M., Muller B., et Tardieu F., 2004: Dealing with the genotypexenvironment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. *Journal of Experimental Botany* 55, 2461-2472.

Ribaut J.M. et Hoisington D., 1998: Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3, 236-239.

Ritchie J.T. et Smith D.S.N., 1991: Temperature and crop development. In J.Hanks and J.T.Ritchie (ed.) *Modelling plant and soil systems*. Agron. Monogr. 31. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 5-29.

Robelin M., 1967: Action et arrière-action de la sécheresse sur la croissance et la production du tournesol. *Annales d'agronomie* 18, 579-599.

Rothschild M.F. et Soller M., 1997: Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* 8, 13-

Sadras V.O. et Hall A.J., 1988: Quantification of temperature, photoperiod and population effects on plant leaf area in sunflower crops. *Field Crops Research* 18, 185-196.

Schneiter A.A. et Miller J.F., 1981: Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21, 901-903.

Steinmaus S.J., Prather T.S., et Holt J.S., 2000: Estimation of base temperatures for nine weed species. *Journal of Experimental Botany* 51, 275-286.

Tardieu F., Reymond M., Muller B., Granier C., Simonneau T., Sadok W., et Welcker C., 2005: Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 56, 937-946.

Tenreiro P.C., Pinto P.A., Braga R.P., et Rodrigues M.R., 1994: Winter sowing and higher population as dry-farming strategies on sunflower crop (*helianthus annuus* L.). *Proc.3rd ESA Congress, Abano-Padova*.

Tollenaar M., 1989: Response of dry matter accumulation in maize to temperature: I. Dry matter partitioning. *Crop Science* 29, 1239-1246.

Touchard C., 2006: Recherche de QTLset choix de cibles stratégiques pour l'amélioration de la tolérance aux basses températureschez le maïs. *thèse de doctorat* 224pp-

Unger P.W., 1980: Planting date effects on growth, yield, and oil of irrigated sunflower. *Agronomy Journal* 72, 914-916.

Verheul M.J., Picatto C., et Stamp P., 1996: Growth and development of maize (*Zea mays* L.) seedlings under chilling conditions in the field. *European Journal of Agronomy* 5, 31-43.

Verheul M.J., Van Hassel P.R., et Stamp P., 1995: Comparison of maize inbred lines differing in low temperature tolerance: effect of acclimation at suboptimal temperature on chloroplast functioning. *Annals of Botany* 76, 7-14.

Villalobos F.J., Hall A.J., Ritchie J.T., et Orgaz F., 1996: OILCROP-SUN: A development, growth, and yield model of the sunflower rop. *Agronomy Journal* 88, 403-415.

Wada H., Gombos Z., et Murata N., 1994: Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4273-4277.

Wallach D., 2006: Working with Dynamic Crop Models: Evaluation, Analysis, Parameterization, and Applications. *D.Wallach, D.Makowski and J.W.Jones, Editors Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*, 447-

Wanjura D.F., Buxton D.R., et Stapleton H.N., 1970: A temperature model for predicting initial cotton emergence. *Agronomy Journal* 62, 741-743.

- Wanner L.A. et Junttila O., 1999: Cold-induced freezing tolerance in arabidopsis. *Plant Physiology* 120, 391-400.
- Wheeler T.R. et Ellis R.H., 1991: Seed quality, cotyledon elongation at suboptimal temperatures, and the yield of onion. *Seed Science Research* (1991), 1:57-67 1, 57-67.
- Whisler F.D., Acock B., Baker D.N., Fye R.E., Hodges H.F., Lambert J.R., Lemmon H.E., Mckinion J.M., et Reddy V.R., 1986: Crop simulation models in agronomic systems. *Advances in agronomy* 40, 141-208.
- Xin Z. et Browse J., 2000: Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and environment* 23, 893-902.
- Yelenosky G. et Guy C.L., 1989: Freezing yolerance of citrus, pinach, and petunia leaf tissue : osmotic adjustment and sensitivity to freeze induced cellular dehydration. *Plant Physiology* 89, 444-451.
- Yin X., Kropff M.J., McLaren G., et Vispera R.M., 1995: A nonlinear model for crop development as a function of temperature. *Agricultural and Forest Meteorology* 77, 1-16.
- Yin X., Chasalow S.D., Dourleijn C.J., Stam P., et Kropff M.J., 2000: Coupling estimated effects of QTLs for physiological traits to a crop growth model: predicting yield variation among recombinant inbred lines in barley. *Heredity* 85, 539-549.
- Zeng Z.B., 1994: Precision mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136, 1457-1468.
- Zhi-Hong Z., Li S., Wei L., Wei C., et Ying-Guo Z., 2005: A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 168, 527-534.
- Zhou W.C., Kolb F.L., Bai G.H., Domier L.L., Boze L.K., et Smith N.J., 2003: Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding* 122, 40-46.